N° d'enregistrement au
C.N.R.S. : A.O. 7529

THESE DE DOCTEUR-INGENIEUR

présentée

A L'UNIVERSITE - PARIS VI

par

Etienne TRENTESAUX

pour obtenir le grade de Docteur-Ingénieur

Sujet de la thèse :

"EVOLUTION DE CERTAINES CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES, BIOCHIMIQUES ET TECHNOLOGIQUES DU BLE EN GRAIN (T. aestivum L.) EN FONCTION DE LA TEMPERATURE, DE L'HYGROMETRIE ET DE LA DUREE, EN ATMOSPHERE RENOUVELEE.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE EXTRACTIBLE DU CARYOPSE DE BLE."

Soutenue le : 3.10.1972 devant la Commission d'Examen

MM. R. ULRICH Président

P. MAZLIAK } Examinateurs

A. GUILBOT }

N° d'enregistrement au
C.N.R.S. : A.O. 7529

THESE DE DOCTEUR-INGENIEUR

présentée

A L'UNIVERSITE - PARIS VI

par

Etienne TRENTESAUX

pour obtenir le grade de Docteur-Ingénieur

Sujet de la thèse :

"EVOLUTION DE CERTAINES CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES, BIOCHIMIQUES ET TECHNOLOGIQUES DU BLE EN GRAIN (T. aestivum L.) EN FONCTION DE LA TEMPERATURE, DE L'HYGROMETRIE ET DE LA DUREE, EN ATMOSPHERE RENOUVELEE.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE EXTRACTIBLE DU CARYOPSE DE BLE."

Soutenue le : 3.10.1972 devant la Commission d'Examen

MM. R. ULRICH Président

P. MAZLIAK } Examinateurs

A. GUILBOT }

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

à ma mère, à mon père,

à mon épouse et compagne

AVANT-PROPOS

Cette étude a pu être réalisée grâce à l'appui bienveillant de Monsieur GUILBOT, Directeur de Recherches à l'I.N.R.A. En me proposant le sujet de travail, en m'accueillant à la Station de Biochimie et Physicochimie des Céréales qu'il dirige, en mettant à ma disposition les moyens de laboratoire de la Station et en m'aidant de ses conseils, Monsieur GUILBOT a largement facilité ma tâche. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je dois également beaucoup à Monsieur MULTON, Ingénieur E.N.S.I.A., Docteur ès Sciences, Chargé de Recherches à l'I.N.R.A., qui a guidé mes débuts dans la recherche, et m'a toujours prodigué très amicalement ses conseils et son aide, aussi bien pour la conduite du travail expérimental que pour l'analyse des résultats. C'est une grande satisfaction pour moi que de lui exprimer mes remerciements et ma très reconnaissante amitié.

A Monsieur ULRICH, Professeur titulaire de la chaire de Physiologie Végétale Appliquée de la Faculté des Sciences de Paris VI, j'exprime ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a prodiguée en acceptant le patronage de mon travail et en me faisant le grand honneur de présider le Jury.

Je remercie très vivement Monsieur MAZLIAK, Professeur de Physiologie Végétale de la Faculté des Sciences de Paris VI, pour avoir bien voulu accepter la charge d'être le rapporteur de ce travail.

Je me dois aussi de remercier, pour leur aimable collaboration, : Monsieur SANDRET, Ingénieur I.N.A., Professeur titulaire de la Chaire de Biochimie de l'E.N.S.I.A. ; Monsieur COLAS, Ingénieur E.N.S.I.A., chef des laboratoires de l'A.R.I.A. aux Grands Moulins de Paris, et Mademoiselle DARRAS ; Madame POISSON, Maître de Recherches à l'I.N.R.A. et Monsieur CAHAGNIER, Ingénieur C.N.A.M. ; Monsieur MARTIN et Madame DROUET.

Que Monsieur Gérard BRYON, pour sa collaboration dévouée, trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Ma femme, par son aide dans la dactylographie de mon mémoire, m'a apporté un concours que je ne voudrais pas oublier.

Enfin, que toutes les personnes qui, à des titres divers, ont contribué à la réalisation de ce travail veuillent bien accepter ici l'expression de ma gratitude.

Ce travail a pu être réalisé grâce à une aide financière accordée en partie par l'I.N.R.A. et en partie par l'I.T.C.F.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS 1
Table des matières 3
Signes et abréviations utilisés 9
INTRODUCTION 11
TRAVAUX ANTERIEURS 15
1 - Les causes d'altération du grain 15
1-1- Les altérations d'origine biologique 15
1-1-1- Les prédateurs 15
1-1-2- Les micro-organismes 15
1-2- Les altérations dues aux enzymes propres du grain 16
1-3- Les altérations d'origine physique et chimique 16
2 - Les facteurs du milieu 16
2-1- Les différents facteurs jouant un rôle dans l'altération .. 16
2-1-1- Le facteur temps 16
2-1-2- Le facteur température 17
2-1-3- Le facteur hydratation 17
2-1-4- Le facteur composition de l'atmosphère 17
2-2- Action combinée des facteurs du milieu sur les principales causes d'altération 17
2-2-1- Les insectes 17
2-2-2- Les micro-organismes 19
2-2-2-1- Les bactéries 19
2-2-2-2- Les moisissures et levures 19
2-2-3- La dénaturation des protéines 20
2-2-4- Les réactions enzymatiques, action de diverses estérases et facteurs d'acidification 21
3 - Les critères d'appréciation de l'état du grain 22
3-1- Importance et nature de la population microbienne 22
3-2- Les tests rhéologiques et technologiques : alvéogramme Chopin et essai de cuisson 23
3-3- Evolution de la viabilité du grain 24
3-3-1- Evolution de la capacité germinative 24
3-3-2- La vitesse ou énergie de germination 25
3-4- Activité enzymatique extractible du grain 26

4- La ribonucléase : RNA-ase 27
4-1- Classification 27
4-2- Principales caractéristiques des RNA-ases végétales issues de céréales 27
4-2-1- La RNA-ase * 31
4-2-2- La RNA-ase ** 33
4-2-3- Autres enzymes 33
4-3- Evolution de l'activité RNA-asique au cours de la formation du grain 33
4-4- Conclusion 34
5- Conclusion 35

CONDITIONS EXPERIMENTALES 37
1- Matériel biologique étudié 37
2- Technique de stockage expérimental 37
2-1- Etude des enceintes de stockage expérimental 37
2-1-1- Principe de régulation 37
2-1-2- Réalisation pratique 39
2-1-3- Contrôle de la température et de l'humidité relative: H.R., régnant dans l'étuve 39
2-1-4- Etude de la précision de régulation 39
2-2- Détermination du temps moyen de germination : Tm 42
2-2-1- Principe et description de la méthode 42
2-2-2- Etude critique de la méthode 43
2-2-2-1- Influence de la position des semences sur le germoir 43
2-2-2-2- Influence de l'époque de lecture du film et évolution du blé témoin 45
2-2-3- Reproductibilité des résultats 45
2-2-3-1- Reproductibilité du Tm au cours de plusieurs lectures (influence du lecteur) 46
2-2-3-2- Reproductibilité du Tm mesuré sur différents échantillons d'un lot homogène (fluctuation d'échantillonnage) 46
2-2-3-3- Reproductibilité du rapport de deux Tm 47
2-2-4- Conclusion 47
2-3- Dosage de l'acidité "grasse" 47

2-4- Détermination quantitative de la population microbienne des grains 48
2-4-1- Préparation de la suspension microbienne 48
2-4-2- Les milieux de culture 49
2-4-3- Expression des résultats 50
2-5- Description des tests technologiques utilisés 50
2-5-1- La mouture du blé 51
2-5-2- L'alvéogramme Chopin 51
2-5-3- La semi-micro-panification 52
2-6- Méthode de dosage de l'activité RNA-asique dans les céréales 53
2-6-1- Description de la méthode (MULTON, 1969 b) 53
2-6-1-1- Préparation des échantillons à analyser 55
2-6-1-2- Extraction de la RNA-ase 55
2-6-1-3- Purification de la RNA-ase 55
2-6-1-4- Dosage d'activité de la RNA-ase 55
2-6-2- Etude critiqu et remarques portant sur les différentes étapes du mode opératoire 56
2-6-2-1- La préparation des échantillons à analyser.. 56
2-6-2-2- Extraction et purification de la RNA-ase ... 59
2-6-2-3- Dosage d'activité de la RNA-ase 59
2-6-2-4- Reproductibilité des résultats de la méthode 62
2-6-3- Conclusion 64
2-7- Méthode d'extraction, de purification et de fractionnement des enzymes à activité nucléasique du grain de blé 64
2-7-1- Extraction 64
2-7-2- Premier stade de purification 64
2-7-3- Désalification et concentration de l'extrait 66
2-7-4- Gel-filtration 67
2-7-4-1- Choix de la solution tampon 67
2-7-4-2- Choix du Sephadex 67
2-7-5- Conclusion 67
3- Protocole expérimental 68
3-1- Description des stockages expérimentaux 68
3-2- Etude critique du protocole expérimental 69
3-3- Durée des stockages expérimentaux 73

RESULTATS OBTENUS ET DISCUSSION 75

1- Activité RNA-asique 77

1-1- Evolution de l'activité RNA-asique des échantillons témoins. 77

1-1-1- Description des phénomènes observés 77

1-1-2- Essais d'interprétation 78

1-1-3- Fractionnement 79

1-1-4- Prospective 80

1-2- Evolution de l'activité RNA-asique des échantillons stockés à différentes humidités relatives à 25 et 30°C 83

1-2-1- Invariance du rapport A/A_t du blé Cappelle 1968, au début du stockage 83

1-2-2- Accroissement du rapport A/A_t pour le blé Cappelle 1968 stocké à H.R. de 95 % à +25°C 84

1-2-3- Décroissance du rapport A/A_t lors d'un stockage prolongé du blé Cappelle 1968 à +30°C 84

1-3- Discussion des résultats obtenus 87

2- Capacité germinative : C.g. et temps moyen de germination : Tm .. 88

2-1- Evolution de la C.g. au cours des stockages expérimentaux .. 88

2-2- Evolution du rapport Tm/Tm_t au cours des stockages expérimentaux 93

2-3- Conclusion 93

3- Variations de l'acidité "grasse" extractible (A.G.) du grain 94

3-1- Evolution de l'A.G. en fonction de la durée de stockage 94

3-2- Evolution de l'A.G. en fonction de la température et de l'H.R. de stockage 97

3-3- Caractéristiques de la fraction lipidique des grains présentant une acidité "grasse" élevée par rapport à celle du témoin 101

3-4- Conclusion 102

4- Evolution de la microflore du blé 103

4-1- Evolution des bactéries 103

4-2- Evolution des moisissures 104

4-2-1- Evolution quantitative 104

4-2-2- Evolution qualitative de la population fongique au cours des stockages expérimentaux 104

4-3- Conclusion 106

5- Caractéristiques technologiques de la farine issue des blés stockés 106

5-1- Les alvéogrammes Chopin 106

5-2- Essai de cuisson standardisé 109

5-3- Conclusion 111

6- Discussion et Conclusion 111

6-1- Evolution de l'A.G. extractible en fonction de la C.g. 112

6-2- Evolution de l'A.G. et du rapport Tm/Tm_t en fonction de la durée de stockage 115

6-3- Evolution de l'A.G. et du nombre de moisissures en fonction de la durée de stockage 115

6-4- Discussion des résultats obtenus 116

CONCLUSIONS GENERALES 121

1- Critique des appareillages et méthodes employés 121

2- Résultats obtenus lors des stockages expérimentaux 122

2-1- Activité RNA-asique 123

2-2- Acidité "grasse" et contamination fongique 123

2-3- Temps moyen de germination : Tm et Capacité germinative : C.g. 124

2-4- Caractéristiques technologiques de la farine obtenue à partir du blé stocké 124

3- Perspectives 125

- Publications 127

- ANNEXE : Les ribonucléases végétales 129

I - Principales caractéristiques des RNA-ases végétales autres que celles issues de céréales 129

II - Effet d'un traumatisme sur l'activité RNA-asique des tissus végétaux 133

III - Evolution de l'activité RNA-asique lors de la germination .. 138

IV - Conclusion 139

- Références bibliographiques 141

- Bibliographie sur la Ribonucléase 149

SIGNES ET ABREVIATIONS UTILISES

(La norme C.N.R.S. a été employée chaque fois que cela a été possible.)

A B A	Acide abscissique.
A.G.	Acidité "grasse".
AIA	Acide β indol-acétique (appelé aussi auxine).
ARNs,r,t,m	Acide ribonucléique soluble, ribosomal, de transfert, messager.
C	Concentration.
°C	Degré Celsius.
CAP	Chloramphénicol.
C.g.	Capacité germinative.
2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxi-acétique.
d.d.l.	Degrés de liberté.
DNA -ase	Désoxyribonucléase.
DOC	Désoxycholate.
EDTA	Acide éthylènediaminotétracétique (appelé aussi versène).
F.C.R.	Force centrifuge relative.
fig.	Figure.
g	Gramme.
GA_3	Acide gibérellique.
°GL	Degré alcoométrique centésimal.
h	Heure.
H.R.	Humidité relative.
H.R.E.	Humidité relative d'équilibre.
j	Jour.
k	Kilo.
l	Litre.
M	Masse molaire.
meq.	Milliéquivalent.
mn	Minute.
N	Normale (concentration).
P M	Poids moléculaire.
réf.	Référence.
RNA -ase	Ribonucléase.
s	Seconde.
S.S.	Substance sèche.
S.H.	Substance humide.
t	Température.
tabl.	Tableau.
Tm	Temps moyen de germination.
μ	Force ionique

ABREVIATIONS et SYMBOLES POUR LES ACIDES NUCLEIQUES, LES POLYNUCLEOTIDES et LEURS CONSTITUANTS (Biochem. J. 1970, 120, 449-454). (Selon l'IUPAC - IUB - CBN).

I - ABREVIATIONS

ARN : acide ribonucléique.

ADN : acide désoxyribonucléique.

II - SYMBOLES

II-1- Purines et pyrimidines

Ade : adénine	Cyt : cytosine
Gua : guanine	Ura : uracile
Pur : purine non spécifiée	Thy : thymine
Base : base inconnue	Pyr : pyrimidine non spécifiée

II-2- Nucléosides

A : adénosine ; G : guanosine ; C : cytidine ...

R : nucléoside purique non spécifié

Y : " pyrimidique non spécifié

N : " non spécifié

dA, dG, ... : désoxyadénosine, désoxyguanine, etc...

p : groupement phosphoryle

pA : adénosine monophosphate (ou AMP)

pppc : cytidine triphosphate (ou CTP) ...

II-3- Oligo et polynucléotides

Si p précède une lettre capitale, cela signifie que le groupement phosphoryle est fixé en 5' sur le pentose. Si p suit la lettre capitale, le groupement phosphoryle est fixé en 3' sur le pentose.

Ex. : pCpA : 5'-phosphocytidine-3'-adénosine-5'-phosphate.

A-G-Up : 3' → 5' trinucléotide avec un 3' phosphate terminal.

A-G-U>p : même nucléotide mais avec un 2':3' phosphate cyclique terminal.

pA-G-U : même nucléotide, commençant avec un 5' phosphate et se terminant par l'uridine sans spécification du 2' ou 3' terminal.

INTRODUCTION

L'agriculture évolue dans ses techniques et ses structures, ce qui ne va pas sans soulever de nouveaux problèmes. Ainsi, la récolte précoce et rapide de grains souvent humides, leur stockage pendant des durées de plus en plus longues et en masse considérable, la réapparition d'un pré-stockage à la ferme, ont donné une nouvelle dimension au problème de la conservation. Ceci se traduit à tous les niveaux par une prise de conscience des phénomènes qui se déroulent lors du séchage et de l'entreposage, et de leur répercussion sur la qualité des grains.

Le problème de la conservation peut être défini comme la recherche des conditions permettant de limiter ou d'inhiber le plus longtemps possible les différentes causes d'altération. Dans le cas des céréales, il revêt certains aspects particuliers qui font son originalité ; d'une part, cette matière granulaire possède une atmosphère interstitielle importante et présente une faible conductibilité thermique ; d'autre part, un lot de grains constitue un ensemble d'organismes vivants - germe et microflore - normalement associés.

Une analyse détaillée des phénomènes liés à la conservation conduit, on le verra, à distinguer les causes d'altération et les facteurs du milieu qui en conditionnent l'activité.

Les symptômes de l'altération qui se produit au sein d'une masse de blé peuvent être globaux et correspondre à l'état général du grain (perte de viabilité, modification de la respiration), ou au contraire particuliers (modification de l'activité de certaines enzymes, produits du métabolisme, etc...).

L'interprétation de ces symptômes doit être faite d'un double point de vue :

a) L'état instantané du lot de grains correspond aux manifestations actuelles d'altération dans le lot ; il représente en fait la valeur potentielle d'utilisation immédiate du grain pour une technologie donnée.

b) L'état prospectif du lot de grains correspond au risque potentiel qu'il représente pour un stockage à venir ; son diagnostic comporte l'étude des causes d'altération existant dans le grain, de l'état instantané du lot, et des facteurs du milieu.

Le mode d'approche pour l'étude de la durée probable de conservation, en vue d'une utilisation technologique donnée, d'un lot de céréales présentant un état sanitaire optimal, consiste généralement à choisir un critère d'altération représentatif, puis à étudier l'évolution de ce critère en fonction du temps, pour diverses combinaisons des facteurs du milieu.

Les résultats de ce travail de base peuvent ensuite être interprétés en fonction des normes de qualité existant dans chaque pays. On aboutit ainsi à établir des diagrammes donnant les durées probables de conservation, en fonction de la température et de l'hydratation, en vue d'une technologie donnée (LINKO, 1960 - GUILBOT et POISSON, 1963 - ROBERTS et ABDALLA, 1968).

Cependant, ces diagrammes ne sont applicables qu'à un lot de grains se trouvant dans un état sanitaire initial équivalent à celui du lot de référence utilisé.

Or, les critères classiquement utilisés permettent très difficilement de déceler les premiers stades de l'altération.

Il s'est donc avéré nécessaire de définir des tests très sensibles, permettant d'apprécier le début d'altération du lot, tests dont les résultats permettraient d'affecter d'un facteur correctif les indications du diagramme isochrone.

C'est pourquoi MULTON et GUILBOT (1968 b), MULTON (1969 a) ont orienté leurs recherches vers deux nouveaux tests d'altération, dont ils ont montré dans un premier temps la sensibilité vis-à-vis des traitements thermiques :

- La mesure du Temps Moyen de Germination donne un aspect global de l'état d'altération, en reflétant l'état général des protéines, et notamment des enzymes du grain. La reproductibilité et la précision médiocres des mesures classiques de capacité et d'énergie germinatives ont conduit à rechercher un test plus sensible dans ce domaine. Les études antérieures ayant montré l'intérêt que présente la mesure du temps moyen de germination, nous avons pensé qu'il était intéressant d'en poursuivre l'étude au cours du stockage.
- La mesure de l'Activité Ribonucléasique extractible permet d'apprécier, au contraire, un aspect particulier, celui d'altération d'un système enzymatique. Son étude, dans le cas des chocs thermiques (MULTON,1969 a), a déjà donné des résultats encourageants, ainsi que le travail de BOOTH (1948) pouvait le laisser espérer.

Nous avons été incités à étudier l'évolution de cette activité enzymatique dans le blé au cours du stockage car, en premier lieu, la structure et les propriétés de la RNA-ase pancréatique sont assez connues ; en second lieu, la RNA-ase agit sur les acides ribonucléiques et, par conséquent, se trouve liée aux mécanismes de la synthèse protéique ; en troisième lieu, la RNA-ase joue un rôle, encore mal connu d'ailleurs, dans les phénomènes de sénescence, de traumatisme ou de privation de la plante (cf. travaux antérieurs et annexe).

Notre travail a consisté, après avoir fait l'étude critique des méthodes de mesure du temps moyen de germination et de l'activité RNA-asique, à les améliorer dans toute la mesure du possible.

Puis, nous avons soumis différents lots de blé à des stockages expérimentaux, afin d'étudier la réponse des deux tests choisis, en la comparant à celle de tests classiques (population microbienne, acidité grasse, essai de cuisson, alvéogramme). Enfin, quelques essais préliminaires ont pu être réalisés en vue de la purification et de l'isolement de la RNA-ase de blé.

Après avoir résumé les principales connaissances dans les domaines ainsi étudiés, nous présenterons l'étude critique des matériels, des méthodes utilisées, et du protocole expérimental mis en oeuvre. Puis nous discuterons les résultats obtenus au cours de cette étude et nous essayerons d'en dégager les perspectives d'avenir.

TRAVAUX ANTERIEURS

Les altérations du blé au cours du stockage en atmosphère renouvelée peuvent avoir différentes origines selon les conditions de température et d'humidité. ANDERSON (1954), BARTON (1961), GUILBOT et POISSON (1963), KREYGER et al. (1963), CHRISTENSEN et KAUFMANN (1965-1969), MULTON et al. (1969), TRISVYATSKII (1969), ont présenté des analyses générales de ce problème dont nous allons essayer de dégager l'essentiel.

1- LES CAUSES D'ALTERATION DU GRAIN.

1-1- Les altérations d'origine biologique.

Elles sont dues à des êtres vivants. Si l'on excepte l'action des rongeurs et des oiseaux, ce sont essentiellement les insectes, les acariens et les micro-organismes qui sont en cause. Leur présence constitue un risque considérable, car leur action se traduit par la décomposition du milieu dont ils vivent et par la libération de substances nouvelles dans le caryopse : enzymes, toxines et autres résidus de leur métabolisme.

1-1-1- Les prédateurs.

Les insectes et les acariens qui vivent dans le blé posent des problèmes souvent sous-estimés (ANDERSON, 1954). Ils sont une cause d'altération grave par la consommation qu'ils font des denrées, par les contaminations dont ils sont les vecteurs, et aussi par les toxines qu'ils sécrètent.

1-1-2- Les micro-organismes.

Par leur activité, les micro-organismes contribuent à la dégradation de la valeur d'utilisation des grains. Il est cependant très difficile d'évaluer, dans un processus d'altération, la part revenant respectivement au grain et à la microflore considérés isolément.

De plus, le métabolisme des micro-organismes modifie la composition glucidique, lipidique et protidique du milieu.

Plus encore que l'action des bactéries, c'est celle des moisissures,et plus particulièrement celle des Penicillium et des Aspergillus, qui est à craindre au cours du stockage (CHRISTENSEN et KAUFMANN, 1965). Ces moisissures ont une activité lipolytique souvent importante, qui se traduit par l'augmentation de l'acidité grasse. A. restrictus est particulièrement redoutable, car il est capable de se développer lentement à 20°-25°C dans des grains ayant une teneur en eau de 14 à 15 % S.H. Les activités amylasiques et protéolytiques (SPICHER, 1958) de certains Penicillium et Aspergillus ont également été mises en évidence.

Par ailleurs, le développement de certains Fusarium, Cladosporium, Mucors, Aspergillus, Cephalosporium et Penicillium présente des dangers de toxicose en alimentation humaine et animale. Les aflatoxines élaborées essentiellement par A. flavus peuvent entraîner la mort.

1-2- Les altérations dues aux enzymes propres du grain.

Les protéases, les amylases et les lipases, dont les actions ont été particulièrement étudiées, interviennent en donnant des produits plus aisément dégradables. Ainsi, la lipase libère des acides gras qui sont ensuite oxydés plus facilement que les triglycérides dont ils proviennent.

1-3- Les altérations d'origine physique et chimique.

Les altérations d'origine physique sont dues, pour la plupart, à des chocs entraînant des cassures ou des fissurations ; celles-ci favorisent l'action des autres causes d'altération.

Les altérations d'origine chimique sont de nature très variée ; elles sont essentiellement la cause des réactions de Maillard, de la dénaturation des protéines, de la dégradation de la structure de l'amidon et de la destruction des vitamines.

2- LES FACTEURS DU MILIEU.

2-1- Les différents facteurs jouant un rôle dans l'altération.

2-1-1- Le facteur temps introduit la notion de vitesse de réaction dont la connaissance permet d'estimer une durée probable de stockage.

2-1-2- Le facteur température joue pratiquement sur toutes les réactions en activant l'énergie cinétique des molécules, selon une loi sensiblement exponentielle.

2-1-3- Le facteur hydratation est l'un des plus importants à considérer. On a pu en effet montrer qu'il existe de véritables seuils au-dessous ou au-dessus desquels, pour une température donnée, l'activité des causes d'altération se trouve inhibée : c'est ce que montre la figure 1. On y voit que, en général, aucune réaction biochimique ne peut avoir lieu sans un minimum d'eau solvante.

L'eau solvante est représentée sur la fig. 1 par la partie située entre la droite menée à partir du point d'inflexion à la courbe de désorption, et celle-ci, pour une valeur d'abscisse supérieure à 14 % S.H. de teneur en eau. L'eau non solvante est constituée, selon GUILBOT et LINDENBERG (1960), par : "la somme d'eau d'absorption primaire, plus l'eau d'absorption en état de solution solide dans les macromolécules" du matériel biologique considéré.

2-1-4- Le facteur composition de l'atmosphère intervient différemment sur la nature du métabolisme des microorganismes et des cellules vivantes du grain, selon les proportions relatives en oxygène et en CO_2 (PIXTON et al., 1964-1967 ; CHRISTENSEN, 1955).

2-2- Action combinée des facteurs du milieu sur les principales causes d'altération.

2-2-1- Les insectes.

Dans les conditions optimales de température et d'humidité, soit environ 25-30°C et 75-90 % d'H.R. (BADONNEL, 1943), la multiplication des insectes est parfois prodigieusement rapide ; elle est encore favorisée par une mauvaise aération et une faible luminosité (LEPIGRE, 1951). BURGES et BURREL (1964) ont établi un diagramme indiquant les zones de H.R. - t. pour lesquelles l'échauffement dû aux insectes se manifeste. JAY et al. (1971) ont plus particulièrement étudié l'importance de la composition de l'atmosphère sur le développement des insectes.

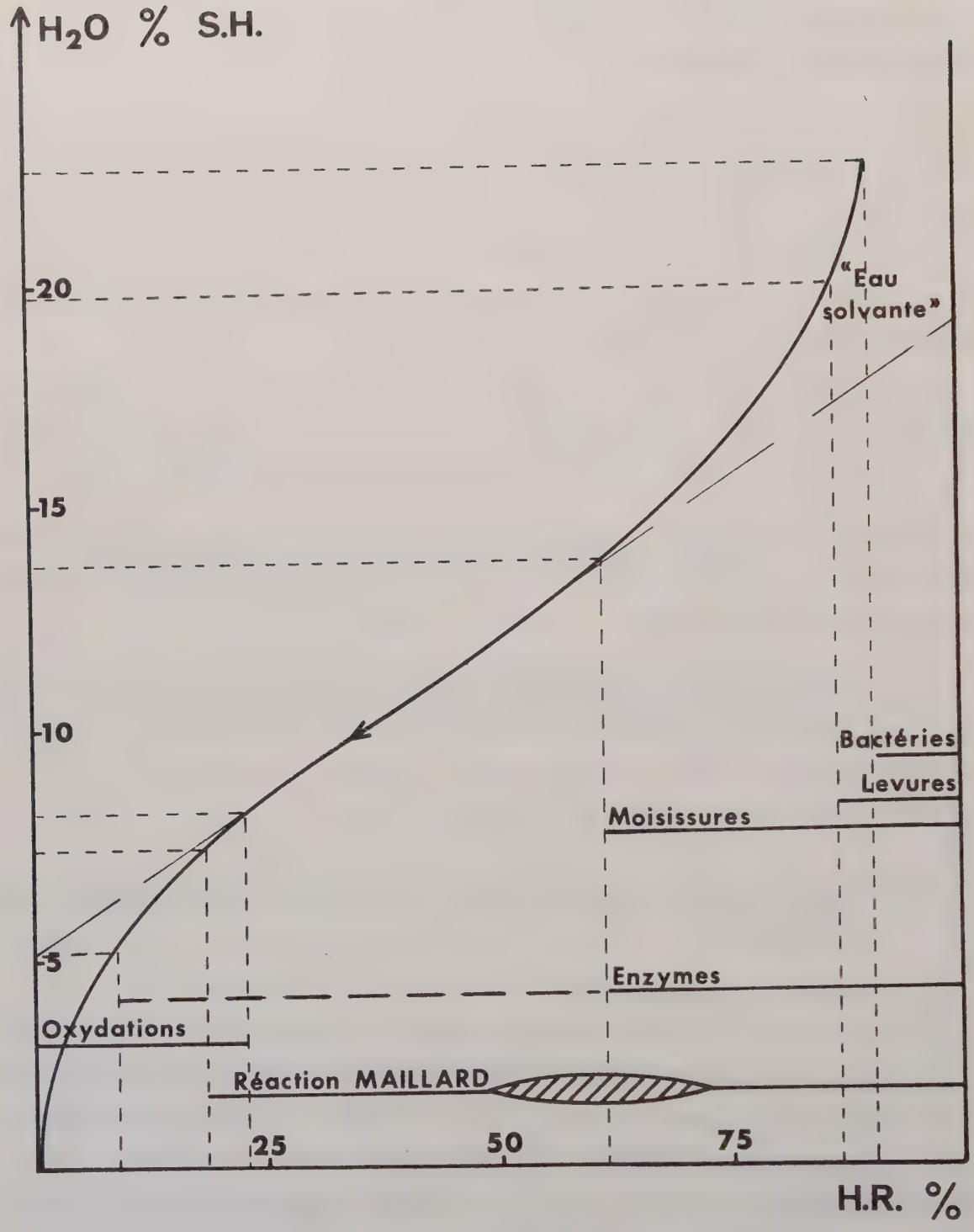


Fig. 1 : Courbe de désorption du blé, vers 20°C, montrant les zones d'action du facteur humidité relative sur les principales causes d'altération.

2-2-2- Les micro-organismes.

Pour les températures moyennes (20°C), les zones hydriques de développement des différents micro-organismes se trouvent schématisées sur la fig. 1.

2-2-2-1- Les bactéries.

Les bactéries mésophiles non osmophiles exigent une H.R.E. (°) minimum de 90-95 % pour commencer à se multiplier (SEMENIUK, 1954). A 22°C, LAGRANDEUR et POISSON (1968) constatent,dans le cas du maïs, que le nombre de bactéries fluctue de 10^7 à 10^2 germes par g, après 200 jours de stockage, à des H.R.E. comprises entre 68 et 95 %. A +5°C, quelle que soit l'H.R.E. située entre ces dernières valeurs, la quantité de bactéries reste sensiblement constante (10^7 germes par g).

Certains auteurs comme STAWICKI et KAMINSKI (1965), SPICHER (1958-1968), CHRZANOWSKA (1967) confirment ces résultats tout en les précisant selon leurs conditions expérimentales et le matériel biologique étudié. Ils notent, en particulier, l'influence des impuretés dont la présence facilite le développement bactérien, mais ils s'attachent plus spécialement au développement qualitatif des bactéries.

En résumé, il apparaît donc que, sauf pour les blés très humides, le nombre de bactéries diminue au cours du stockage d'autant plus vite que la température est plus élevée.

2-2-2-2- Les moisissures et levures.

Dès 1947, MILNER et al. ont dénombré les moisissures apparues sur le blé au cours d'expériences de conservation. Après 20 j de stockage à +30°C et à 12 % S.H. de teneur en eau, il y a 500 germes par g et ce nombre s'élève d'autant plus que l'hydratation est plus élevée, pour atteindre 67.10^6 germes par g à une teneur en eau de 38 % S.H.

Ces chiffres sont confirmés par d'autres auteurs : CHRISTENSEN (1951 et 1955), TUITE et CHRISTENSEN (1957 a et b), PAPAVIZAS et CHRISTENSEN (1958), TUITE (1959), CHRISTENSEN et HODSON (1960). Ces travaux ont été rassemblés dans les revues générales de CHRISTENSEN et KAUFMANN (1965) et (1969).

(°) H.R.E. : En présence d'une substance hydratée en équilibre avec son atmosphère, le terme de "Humidité relative d'équilibre" est alors souvent employé, préférentiellement à 'Humidité relative" (LONCIN,1961).

En résumé, il apparaît que, dans la zone des H.R.E. supérieures à 70-75 % et jusque vers 40°C, les moisissures se multiplient d'autant plus rapidement que la température et l'H.R.E. sont plus élevées ; dans la zone hydrique de non prolifération, leur nombre est fonction décroissante de ces facteurs. Ainsi, il apparaît nettement que le facteur prédominant du développement des moisissures est l'H.R.E. de la céréale.

Au point de vue qualitatif, lors du stockage en atmosphère renouvelée, la flore champêtre (Cephalosporium, Verticillium, Fusarium, Cladosporium, Alternaria) et la flore de stockage (Penicillium et Aspergillus) se multiplient aux fortes humidités. Aux H.R.E. moyennes, seules les espèces de stockage se développent. Aux faibles H.R.E., ce sont ces espèces qui persistent le plus longtemps aux températures moyennes, alors que les espèces champêtres se maintiennent assez longtemps aux basses températures.

Enfin, on peut dire que les levures suivent une évolution analogue.

De nombreux micro-organismes peuvent libérer dans le milieu des toxines qui altèrent gravement la qualité hygiénique des grains. L'intérêt porté à cet aspect de la microbiologie céréalière va grandissant depuis quelques années (HUNTER et TUITE, 1967 ; NICOLET, 1968 ; MOREAU, 1968 et 1970 ; MIROCHA et al.,1968 ; JEMMALI et al., 1969). Ce sont les Fusarium, les Cladosporium, les Mucors, les Cephalosporium, les Aspergillus (amstellodami, ochraceus, ventii, flavus ...) et les Penicillium, hôtes normaux et habituels des grains, qui sont les plus dangereux à cet égard. Les mycoses et mycotoxicoses provoquées par la flore céréalière peuvent aller de l'accident léger jusqu'à la mort. Une même moisissure peut produire plusieurs toxines et inversement une même toxine peut être élaborée par des groupes systématiques parfois éloignés.

En conclusion, on peut dire que le développement des moisissures constitue la cause essentielle des détériorations d'origine microbienne dans les grains stockés en atmosphère ventilée.

2-2-3- La dénaturation des protéines.

Assez peu d'études ont été effectuées sur les dénaturations en milieu solide peu hydraté. L'eau y joue un rôle important qui a pu être précisé, en particulier dans le cas du blé, par l'étude de l'inactivation de la ribonucléase (MULTON, 1969 a).

2-2-4- Les réactions enzymatiques, action de diverses estérases et facteurs d'acidification.

Différents travaux ont précisé les modalités de l'action des enzymes dans les milieux peu hydratés (DRAPRON et GUILBOT, 1962), (GUILBOT, 1967). Il a été montré que la plupart des systèmes enzymatiques ne fonctionnent avec une vitesse appréciable que dans un milieu dont l'H.R.E. est suffisamment élevée pour que le seuil d'apparition de l'eau solvante soit dépassé (fig. 1). C'est en effet cette fraction d'eau solvante qui permet la diffusion de l'enzyme ou de son substrat dans le milieu. Ceci est confirmé par le fait qu'une enzyme comme la lipase, sur un substrat liquide (huile), n'a pas besoin d'eau solvante pour provoquer la lipolyse et peut être active même pour des H.R.E. très basses, de l'ordre de 2 % (CAILLAT, 1970). Ceci confirme que l'eau intervenant dans l'hydrolyse peut appartenir à une fraction très fortement liée.

La détermination de l'acidité libérée par diverses estérases, et plus particulièrement par la lipase, est souvent utilisée pour apprécier l'état de conservation des céréales et de leurs dérivés. En raison de l'effet tampon des protéines, le pH des céréales ne varie guère, mais par contre l'acidité titrable peut augmenter de façon significative ; les causes en sont généralement variées :

- systèmes enzymatiques : phosphatases, lipases, protéases, lipoxygénases, enzymes de dégradation des glucides ;
- processus chimiques : essentiellement rancissement oxydatif.

GLASS et al. (1959) ont observé que dans le blé conservé en atmosphère renouvelée, à 30°C et à une teneur en eau comprise entre 17,5 et 22 % S.S., l'acidité croît beaucoup plus rapidement qu'à des teneurs en eau inférieures à 17,5 % S.S. Ces auteurs formulent l'hypothèse que l'accroissement d'acidité observé est lié au développement des lipases fongiques.

CHRZANOWSKA (1967), dans son étude portant sur le seigle, relie l'accroissement d'acidité essentiellement à l'humidité du grain. STAWICKI et KAMINSKI (1965) mettent plus particulièrement en évidence le rôle du facteur température. Les conditions limites d'accroissement de l'acidité se situeraient vers une H.R.E. de 65 % et +20°C dans le cas du blé. Ainsi, à 20°C et une H.R.E. de 90 %, l'acidité augmente régulièrement, doublant de valeur après 18 mois de stockage tandis qu'à 3°C et à la même H.R.E., le taux d'acidité reste invariant même après une durée de 24 mois.

BOTTOMLEY et al. (1950) établissent, dans certains cas, une corrélation entre la contamination fongique et l'acidité. Cependant, ils notent qu'en abaissant la teneur en oxygène de 21 à 5 %, la quantité d'acides formés reste constante bien que le nombre de moisissures diminue fortement.

SPICHER (1968) a plus particulièrement étudié l'accroissement d'acidité du blé ensemencé par A. glaucus.

MASSON (1959), dans une étude se rapportant au colza, a suivi l'évolution de l'acidité en fonction du nombre de graines cassées. Il observe, à 20°C et pour une teneur en eau de 7,5 % S.S., que le taux d'acidification varie de 1 à 3 entre les lots comportant 0 et 100 % de graines cassées, cette différence ayant surtout pour origine l'action de la lipase de la graine, et peut-être également l'oxydation non enzymatique de l'huile. En effet, la structure cellulaire est lésée et les surfaces de contact sont nettement augmentées, ce qui accroît la vitesse des phénomènes.

Par ailleurs, SORGER et al. (1955) établissent une corrélation entre la diminution de la capacité germinative et l'accroissement d'acidité grasse chez les blés dur et tendre, malheureusement sans spécifier la teneur en eau des céréales et l'état de contamination fongique.

En résumé, l'augmentation d'acidité "grasse" est étroitement liée aux facteurs température, humidité, teneur en oxygène de l'atmosphère, ainsi qu'à l'état physique et sanitaire du grain.

3- LES CRITERES D'APPRECIATION DE L'ETAT DU GRAIN.

3-1- Importance et nature de la population microbienne.

Le dénombrement et l'identification des différentes espèces prédominantes sur le grain reflètent les conditions de stockage auxquelles il a été soumis. Selon GUILBOT et POISSON (1963), un blé ayant une population fongique inférieure à $3,2 \times 10^4$ germes par g peut être considéré, en première approximation, comme utilisable en panification.

Par ailleurs, le dosage des mycotoxines constitue un test très important de la valeur hygiénique des grains (SHOTWELL et al., 1970) ; ce test n'est cependant pas toujours suffisant par lui-même.

Actuellement, des recherches sont effectuées (DAFTARY et al., 1970 a et b, POMERANZ, 1971) afin de mettre au point une méthode de détection des micro-organismes par les produits volatils que ceux-ci peuvent dégager.

En outre, on a vu qu'une forte quantité d'Alternaria révèle un grain récolté depuis peu. De même, la présence de certains Penicillium est caractéristique d'un stockage à basse température et sous une H.R.E. élevée.

3-2- Les tests rhéologiques et technologiques : alvéogramme Chopin et essai de cuisson.

La valeur boulangère d'un blé représente son aptitude à fournir un pain bien développé, d'un bel aspect, d'une odeur et d'une saveur agréables. Correctement effectué, l'essai de panification permet d'apprécier cette valeur boulangère, bien qu'il ne permette pas toujours de déceler la cause des anomalies constatées (GUILBOT 1969, I.T.C.F. 1970). Mais le dosage de l'acidité "grasse" et certains essais rhéologiques comme l'alvéogramme Chopin apportent des indications complémentaires de la valeur boulangère.

Selon GUILBOT et POISSON (1963), POISSON et al. (1967), l'alvéogramme des farines obtenues à partir de blés stockés entre 15 et 35°C et de teneurs en eau de 19 à 23 % S.S., montre au cours de la conservation une amélioration certaine avant que l'allure n'en soit altérée. GUILBOT (1960) explique ce fait, dans le cas de blé stocké en atmosphère confinée, par l'action de certains produits de fermentation (acétaldéhyde, alcool), cependant que SPICHER (1968) l'attribue à l'influence d'enzymes protéolytiques.

Selon SPICHER (1968), la diminution finale du W est due, pour une très large part, à la contamination fongique et en particulier à la composition de la flore microbienne.

Quoi qu'il en soit, l'altération de l'alvéogramme Chopin se produit d'autant plus rapidement que la température et l'humidité sont plus élevées (GUILBOT, 1960).

Le pain obtenu à partir du blé stocké dans différentes conditions permet de mettre en évidence les modifications de caractère organoleptique se produisant au cours du stockage. Selon STAWICKI et KAMINSKI (1965), le pain présente une odeur et un goût de moisi caractéristiques

quand le blé a été stocké pendant 10 à 12 mois à 90 % d'H.R., à 3°C et à 10°C ; à 20°C, le même résultat est atteint après 3 mois de stockage seulement, cependant que 2 ans après on observe que la porosité du pain est grossière, sa couleur très foncée et son volume accru de 20 à 25 % par rapport à celui du témoin.

SPICHER (1958-1968) a désinfecté deux lots de blé, puis après avoir ensemencé le premier d'entre eux avec A. glaucus (espèce non précisée), les a stockés pendant 30 jours à +30°C et à une teneur en eau de 18 %S.H. Dans ces conditions, "l'indice de qualité" (critère non défini) du pain fait avec le blé du premier lot s'est avéré être 40 % inférieur à celui, demeuré constant, du pain réalisé avec le blé du deuxième lot. Cet exemple montre l'importance prépondérante de la contamination fongique dans la diminution de la valeur boulangère de la farine issue de blés contaminés.

3-3- Evolution de la viabilité du grain.

La germination du grain est, entre autres, la résultante de l'activité de multiples systèmes enzymatiques, sous la dépendance des facteurs température et teneur en eau.

Nous considérons, avec CÔME (1968), que la germination est caractérisée dès l'instant où, après avoir hydraté la semence à un niveau suffisant pour déclencher le phénomène, il devient impossible de la déshydrater à nouveau sans lui faire perdre définitivement son pouvoir germinatif (défini comme le pourcentage de semences aptes à germer dans les conditions les plus favorables).

Différentes mesures de l'aptitude d'un lot de grains à germer sont utilisées pour déceler l'altération des graines au cours du stockage. Il s'agit de la capacité de germination (pourcentage de semences capables de germer dans des conditions bien définies), de la vitesse ou énergie de germination (temps mis par les semences pour germer).

3-3-1- Evolution de la capacité germinative.

LINKO (1960) a présenté sous la forme d'un nomogramme les corrélations qu'il a établies entre l'humidité, la capacité germinative, la température et la durée de stockage dans le cas de blé conservé en atmosphère confinée. Ce nomogramme permet d'évaluer la durée probable de conservation en fonction des conditions de stockage.

ROBERTS (1960), ROBERTS et ABDALLA (1968) traduisent la relation entre l'humidité, la température et la capacité germinative par l'équation : $\log p = k_v - C_1 m - C_2 t$, où p est la durée en semaines au bout de laquelle la capacité germinative est égale à 50 %, t, la température, m, la teneur en eau du grain (exprimée en S.H.), k_v , C_1 et C_2 des constantes dont les valeurs sont différentes selon le grain considéré : pour le blé $k_v = 4,222$, $C_1 = 0,108$ et $C_2 = 0,050$.

Stockée dans de bonnes conditions, une semence peut garder très longtemps une excellente capacité germinative. SIVORI et al. (1968) citent l'exemple de grains de balisier introduits dans des coques de noix trouvées dans une tombe archéologique en Argentine, et ayant gardé la faculté de germer après 550 ans.

La composition et la pression de l'atmosphère jouent aussi des rôles importants dans la germination. BOCKHOLT et al. (1969) ont stocké pendant plusieurs années du maïs à une teneur en eau de 10 % S.H. environ, à la température du laboratoire, et à 10°C, en atmosphère confinée et sous pression réduite (0,226 k/cm^2). A 10°C, après 26 ans, la capacité germinative a diminué de 89 à 47 % sous ce vide partiel et, en atmosphère confinée, de 92 à 25 %. A la température du laboratoire, au bout de 3 ans de stockage, les pourcentages respectifs étaient passés de 95 à 14 % et de 94 à 2 %.

Selon CHRISTENSEN (1965), les moisissures modifient la coloration des grains, provoquent le rabougrissement des caryopses et causent la mort de l'embryon. Les altérations qui se produisent dans l'embryon ont d'ailleurs été particulièrement étudiées par ANDERSON et al. (1970).

De nombreuses études similaires confirment ou complètent ces résultats. Ce sont essentiellement les travaux de GUILBOT et POISSON (1963 a), CHRISTENSEN et KAUFMANN (1965), STAWICKI et KAMINSKI (1965), CHRZANOWSKA (1967), TRISVYATSKII (1969).

3-3-2- La vitesse ou énergie de germination.

Nous empruntons à CÔME (1968-1970) le rappel des critères qui ont pu être proposés par différents auteurs recherchant un mode d'expression de la vitesse de germination plus précis que la classique "énergie germinative" même précisée selon TIMSON (1965). Ainsi, dès 1926, KOTOWSKI a proposé le "coefficient de vélocité", défini par la relation $\Sigma n / \Sigma (n.Jn)$, où n est le nombre de semences germées le $Jn^{ième}$ jour après mise en

germination. ABBOTT (1955) définit avec VISSER (1956) un "indice de germination", sommation du produit du nombre de semences germant le $n^{ième}$ jour par un coefficient égal à $\frac{1}{n}$. Enfin, plus récemment, HARRINGTON (1962), CÔME (1967) et GORDON (1971) utilisent à quelques variantes près l'inverse du "coefficient de vélocité".

Cependant, aucune des méthodes proposées pour ces déterminations ne répond aux caractéristiques suivantes :

- mesure pratiquement continue de l'évolution du nombre de semences germées pendant au moins huit jours ;
- possibilité de mesure par plusieurs opérateurs, simultanément ou non, et de vérification ultérieure des mesures ;
- contrôle précis des conditions hydriques de germination.

Les deux premières conditions imposent en fait un enregistrement photographique de la germination ; la dernière nécessite un dispositif continu et réglable de l'imbibition des semences.

C'est pourquoi, à la suite des premiers travaux effectués par LECOURBE (1960-1961-1962), MULTON et al. (1968) ont mis au point une méthode de détermination du "temps moyen de germination" qui répond à ces divers impératifs. Cette méthode, que nous avons reprise et améliorée, est décrite et discutée ci-après (cf. page 42). Les mêmes auteurs ont montré, dans le cadre d'une étude portant sur des traitements thermiques appliqués au blé, la grande sensibilité du temps moyen de germination pour déceler le début de l'altération thermique de la semence (MULTON, 1969 a).

3-4- Activité enzymatique extractible du grain.

La mesure de certaines activités enzymatiques a été utilisée pour apprécier un aspect particulier de l'altération des semences. Ainsi, dans le cas du blé, LINKO et SOGN (1960), MULTON (1969 a et b) ont proposé respectivement l'étude de l'activité glutamique décarboxylase et de la ribonucléase.

L'étude de l'évolution de l'activité ribonucléasique constituant une part importante de notre travail, il nous a semblé important de relater plus en détail les travaux réalisés sur cette enzyme chez les végétaux.

4- LA RIBONUCLEASE : RNA-ase.

4-1- Classification.

Selon PRIVAT DE GARILHE (1965), les enzymes appelées "nucléolytiques", qui dégradent les acides nucléiques, peuvent être classées en quatre catégories :

- les nucléases,
- les nucléophosphatases,
- les nucléosidases,
- les nucléodésaminases.

Les nucléases se subdivisent en deux classes : d'une part, les endonucléases qui comprennent les nucléases non spécifiques, les ribonucléases (RNA-ase) et les désoxyribonucléases (DNA-ase), et, d'autre part, les exonucléases.

Cette classification nous aidera dans la suite de cette étude pour éviter une certaine confusion qui règne dans la terminologie, accrue du fait que, après un isolement et une purification imparfaite de l'extrait enzymatique, certains auteurs classent les mélanges enzymatiques qu'ils obtiennent sous l'appellation de RNA-ase alors que celle-ci est en réalité contaminée par des nucléases non spécifiques ou des nucléophosphatases.

Les RNA-ases sont largement répandues chez toutes les espèces animales, végétales et microbiennes. Nous avons reporté en annexe une étude comparée aussi exhaustive que possible des RNA-ases d'origine végétale, laissant de côté les RNA-ases d'origine animale et microbienne, à l'exception cependant de la RNA-ase pancréatique et des Takadiastases.

4-2- Principales caractéristiques des RNA-ases végétales issues de céréales (°).

Nos recherches concernant plus particulièrement l'étude du blé, nous avons reporté dans le tableau I les principales propriétés des enzymes nucléolytiques mises en évidence chez les céréales, ainsi que les

---

(°) Pour une meilleure compréhension du texte, on se référera si nécessaire à la liste des abréviations et symboles utilisés (cf. page 10), ainsi qu'au schéma établi page 32 .

TABLEAU I - Propriétés comparées des principales enzymes nucléolytiques des céréales, des RNA-ases pancréatiques et des Takadiastases.

- les enzymes repérées par un même nombre d'astérisques sont vraisemblablement les mêmes, malgré les dénominations différentes.
- nomenclature des nucléotides cf. page 10.

Références principales	Origine	Enzyme, PM, pH optimum	Effecteurs chimiques (M : concentration molaire)		Spécificité d'action sur un substrat ARN et principales caractéristiques
			activateurs	inhibiteurs	
KUNITZ, 1940 MAC DONALD, 1955 STEIN, 1965 BARNARD, 1969	Pancréas de boeuf	RNA-ase I 15.000 - 7,7	Na^+, NH_4^+ si $5.10^{-4} < C < 10^{-1}$	-Mg^{++}, Ca^{++}, Mn^{++} 5.10^{-4} 5.10^{-4}M -Cu^{++}, Zn^{++} 2.10^{-6}M	Rupture des liaisons Yp : Yp et Rp:Rp avec libération de poly (Np).
SATO-ASANO et EGAMI, 1958 TAKAHASHI, 1971 FIELDS et al., 1971	Aspergillus oryzae	Takadiastase T1 11.000 - 7,5 Takadiastase T2 4,5			-Production de Gp plus rapidement que les autres nucléotides -Production de Ap plus rapidement que les autres nucléotides
SODEK et al., 1969-1970	Jeunes feuilles de blé	WL-RNA-ase I* 5,5/6	EDTA 4.10^{-3}M		-Production de poly (N > p) puis poly (Rp). -Accroissement d'activité inhibée par CAP lors d'un traumatisme.
		WL-RNA-ase II** 7/8	Zn^{++}	EDTA 4.10^{-3}M	-Production de poly (pN). -Accroissement d'activité non inhibée par CAP lors d'un traumatisme.

MULTON, 1969 a et b	Grain de blé	Enzymes 5			Mise en évidence d'une dénaturation thermique en deux étapes.
WYEN et al., 1969-1971 a et b WYEN et FARKAS, 1971	Germes d'avoine	RNA-ase* (?)			-Production de poly (N>p) surtout (R>p), puis libèrent essentiellement de 3'G.M.P. -Accroissement d'activité lors d'un traumatisme en une 1ère phase
		Endonucléase* (?) 33.000 - 5,5/6	$Mn^{++}.10^{-2}M$ non activateur	Zn^{++}, Cu^{++}, EDTA $10^{-2}M$	-Production de poly (pN) à partir d'ADN aussi mais libèrent préférentiellement des pA. -Accroissement d'activité lors de traumatisme en une 2e phase.
		Phosphatase 26.000 - 5,0		$P_{inorg.}$	
SRIVASTAVA et al. 1971	Chromatine de jeunes feuilles d'orge	Endonucléase 7,0		Mn^{++}, Co^{++}, Cu^{++}, Cd^{++}, Zn^{++}, Fe^{3+}, Ag^{+} : $10^{-3}M$	

WILSON, 1963 a-b, 1967, 1968 a-b, 1971 HSIAO, 1968 HSIAO et al. 1968	Germes de maïs Cytoplasme	RNA-ase I* 23.000 - 5,2	Mg^{++} à pH 5	Mg^{++} à pH 5,8	-Production de poly (N>p) puis de poly (Rp). -Plus spécifiques des bases Pur.que Pyr.
	Microsomes (et ribosomes)	RNA-ase II** 17.000 - 6/7			Même action mais production de poly (Np).
	Membranes	Nucléase I (ou RNA-ase B ou 3' nucléotidase) 31.000/6,2		Mg^{++} 0,04 M	Production de poly (pN) à partir d'ADN aussi
FIERS et VANDENDRIESSCHE, 1961 FIERS, 1962	Germes d'orge	RNA-ase A 6,1 RNA-ase B 6,1	Ca^{++}, Mg^{++} 0,01M EDTA 10^{-4}M	Cu^{++}, Zn^{++} $1,6\times10^{-3}$M	Thermostables après purification.
MATSUSHITA, 1959 a-b-c-d MATSUSHITA et IBUKI, 1959-60 IBUKI et al., 1963-1964	Germes de blé Albumen	RNA-ase 5,2	EDTA 0,05 M	non activateurs : Ca^{++}, Ba^{++}, Mg^{++} 5.10^{-3}M	produisent des poly (R-Y)
	Cytoplasme	RNA-ase 5,2			
	Microsomes	RNA-ase** 6,0	Ca^{++}, Ba^{++}, Mg^{++} 5.10^{-3}M auxines	EDTA 0,05 M	
	Microsomes de germes de blé	3' nucléotidase 7,5	Ca^{++}, Ba^{++}, Mg^{++} $2,5.10^{-3}$M	Ca^{++}, Zn^{++}, Cu^{++} EDTA $2,5.10^{-3}$M	
		5' nucléotidase 5,0			

principales caractéristiques des RNA-ases du pancréas et des Takadiastases ; ces dernières à titre de comparaison.

L'extraction de ces enzymes est pratiquée à partir de germes, de fractions de germes ou encore de constituants particuliers des cellules du germe (cytoplasme, membranes, microsomes et ribosomes), rarement à partir de la semence. A la suite de purifications plus ou moins élaborées, un certain nombre d'auteurs mettent en évidence différentes enzymes que nous allons indiquer plus en détail.

4-2-1- La RNA-ase *

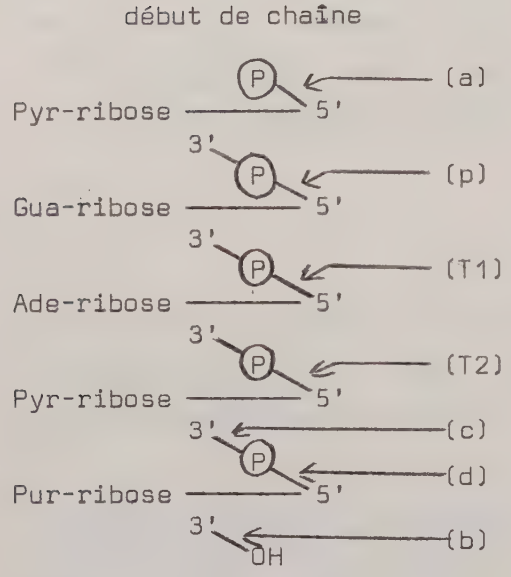
Divers auteurs ont mis en évidence des enzymes qu'ils ont désignées à l'aide de déterminations différentes. Nous pensons qu'en fait il s'agit probablement d'une seule et même enzyme qu'en conséquence nous désignerons dans ce qui suit par RNA-ase*.

En effet, ces enzymes, qui se localisent préférentiellement dans le cytoplasme, ont un pH optimal d'activité variant entre 5 et 6, et un poids moléculaire variant de 12.000 à 23.000, pour des formes que l'on peut supposer être le monomère et le dimère. L'E D T A à la concentration de 10^{-2} ou 10^{-3} M. complexe les métaux lourds qui normalement, à de telles concentrations, inhibent ces enzymes : Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+} ; ces enzymes sont donc activées ou du moins non inhibées par l'E D T A à concentration de l'ordre de 10^{-2}, 10^{-3} M.

Ces enzymes hydrolysent l'ARN en produisant des nucléotides 2':3' phosphates. La rupture s'effectue dans la plupart des cas entre le résidu phosphate attaché au C'3 d'un nucléotide purique et le C'5 du nucléotide suivant dans la séquence avec formation d'un di-ester 2'-3' de l'acide phosphorique et du nucléotide correspondant. Rappelons que, dans le cas de la RNA-ase pancréatique, la rupture s'effectue préférentiellement après un nucléotide pyrimidique, et que, dans une seconde étape, il y a hydrolyse du cycle phospho di-ester, avec formation d'un 3' nucléotide. Les premiers 3' nucléosides formés renferment dans leur grande majorité une base purique. Certains auteurs considèrent même que les seuls 3' nucléosides formés ont une base purique ou même qu'il ne peut s'agir que de 3' GMP. Le mode de scission se rapprocherait donc de celui des Takadiastases.

..

Fig. 2 - Schéma de dépolymérisation de l'ARN par différentes enzymes nucléolytiques à partir d'un polyribonucléotide hypothétique.



Le polyribonucléotide ci-contre peut se représenter schématiquement comme suit (cf. page 10) :

pYpGpApYpR-OH

ou plus simplement : YGAYR-OH.

La dépolymérisation s'effectue par les différentes enzymes comme suit :

1) La RNA-ase pancréatique (p) scinde au niveau des pyrimidines nucléotides à droite et en position 5'. Les fragments formés auront donc tous un pyrimidine nucléotide à leur extrémité droite et un groupement phosphate en 3'.

2) Les RNA-ases T1 et T2 (Takadiastases) scindent au niveau des purines nucléotides à droite et en position 5' ; nucléotide purique contenant la guanosine pour T1 et contenant l'adénine pour T2.

3) Les phosphomonoestérases détachent l'acide phosphorique s'il n'est estérifié que par une seule fonction :
   - 5' phosphomonoestérase (ou 5' nucléotidase) : (a)
   - 3' " (ou 3' ") : (b) si le groupement Ⓟ est en 3' et non OH comme représenté ci-dessus
   - phosphomonoestérase non spécifique qui détache l'acide phosphorique s'il n'est estérifié que par une seule fonction, quelle que soit celle-ci.

4) Les phosphodiestérases agissent sur tous les phosphodiesters, soit en 3' (c), soit en 5' (d).

N.B. - Les enzymes (p), T1 et T2 sont des endonucléases.

- Les phosphomonoestérases et diestérases sont des exonucléases.

4-2-2- La RNA-ase**

Les enzymes repérées par deux astérisques sont très certainement identiques. Elles ont en effet un pH optimum d'activité qui se situe dans une zone proche de la neutralité et elles seraient localisées préférentiellement dans les microsomes, et plus particulièrement dans les ribosomes. En outre, leur PM est beaucoup plus élevé que celui de la RNA-ase*, de l'ordre de 32.000. Mais c'est la nature des activateurs et des inhibiteurs qui différencie le plus ces enzymes des précédentes. En effet, d'une manière générale, les activateurs des RNA-ases* sont des inhibiteurs des RNA-ases** et inversement, pour des concentrations très voisines. Leur action sur de l'ARN de levure produit des nucléotides 2':3' phosphate sans libération préférentielle de nucléotides possédant une base purique ; ces enzymes sont donc moins spécifiques.

4-2-3- Autres enzymes.

Des phosphomonoestérases et des phosphodiestérases ont été mises en évidence dans les céréales par plusieurs auteurs, mais leur étude n'a guère été approfondie. En outre, dans certains cas, il est vraisemblable que ces enzymes sont imparfaitement purifiées et renferment d'autres nucléases.

Une étude plus complète sur ce sujet, se rapportant à l'ensemble des recherches effectuées sur les végétaux, se trouve reportée en annexe.

4-3- Evolution de l'activité RNA-asique au cours de la formation du grain.

La période de la vie du végétal la plus étudiée est la germination. Les recherches qui ont été effectuées sur la semence pendant et au terme de sa formation sont peu nombreuses, mais présentent un intérêt certain et, comme elles entrent plus particulièrement dans le cadre de notre étude, nous allons les indiquer plus en détail.

Selon DALBY et CAGAMPANG (1970), 5 à 10 jours après la pollinisation, l'activité RNA-asique du maïs commence à croître pour atteindre une valeur maximale au 40e jour, puis demeure stable au-delà. MATSUSHITA (1959 d) a étudié les fluctuations d'activité RNA-asique du blé tendre depuis la semaine qui suit la floraison jusqu'au moment de complète

maturation, soit pendant 28 jours. Au terme des 15 premiers jours, il constate que l'activité a augmenté plus de 10 fois par rapport au début des prélèvements ; pendant les 10 jours suivants, l'activité demeure stable, puis commence à décroître. Au moment de la moisson, l'activité RNA-asique a une valeur 3 fois plus faible que celle correspondant au maximum d'activité. Ces travaux corroborent et complètent ceux de SEMENENKO (1955).

KULKA (1969) a étudié l'activité RNA-asique extraite d'embryon de grain d'orge 6, 25 et 55 jours après la moisson, alors que les capacités germinatives sont respectivement de 8, 68 et 100 %. L'auteur met en évidence une activité d'autant plus élevée que la date de moisson est plus éloignée. Plus récemment, GRZESIUK et KULKA (1971) étudient l'activité RNA-asique présente dans l'albumen de grains d'avoine à peine germés ; l'avoine issue de lots récoltés en 1962, 1963, 1964, 1967 présente des capacités germinatives respectivement de 5, 40, 62 et 90 %. Les auteurs constatent que, plus l'avoine est âgée, moins l'activité RNA-asique est élevée.

4-4- Conclusion.

Cette analyse montre combien les enzymes nucléolytiques sont étudiées. Cependant, la localisation, la purification, l'action catalytique des nucléases dans le végétal et plus précisément des ribonucléases sont encore très mal élucidées. En ce qui concerne la purification, on observe deux manières de procéder.

La première consiste à purifier au moyen de méthodes de plus en plus complexes une enzyme présentant une activité RNA-asique. Presque toujours, hélas, l'étude critique de la méthode n'est pas faite, et l'on peut craindre que d'autres ribonucléases ne soient écartées.

La seconde consiste à essayer d'isoler les nucléases issues de parties définies de la cellule (cytoplasme, microsomes, reticulum endoplasmique et ribosomes, ...), mais il est très difficile d'isoler les organites de la cellule sans détruire les activités enzymatiques.

En résumé, on peut dire qu'il semble exister deux RNA-ases. La première, quantitativement prédominante, se comporte en antagoniste de l'ARN dont elle pourrait être un régulateur dans la vie cellulaire. C'est elle qui, lors de traumatismes causés au végétal (cf. annexe), serait synthétisée d'une façon continue. La seconde RNA-ase, très proche de la

première, se localiserait dans les sites actifs de la cellule et, comme la première, aurait un rôle de "feed-back" sur l'ARN. Ces deux enzymes se différencient essentiellement par leur pH optimum d'activité, leur P M, et surtout par le fait que, d'une manière générale, les activateurs de l'une sont les inhibiteurs de l'autre et inversement.

5- CONCLUSION.

Les travaux qui viennent d'être passés en revue montrent la complexité des phénomènes conduisant, en atmosphère renouvelée, à l'altération du blé.

Il s'avère, d'après les publications existantes, que l'on est actuellement en possession surtout de résultats fragmentaires, souvent contradictoires, et qu'il est la plupart du temps difficile de relier du fait que les conditions opératoires sont imprécises. Ainsi, par exemple, la plupart des auteurs se sont attachés à apprécier la réponse du matériel biologique étudié à un test déterminé : mesure de l'activité respiratoire du grain, méthode d'évaluation de la viabilité du grain, méthode de numération de la microflore ; peu d'auteurs ont étudié dans leur ensemble les différents phénomènes qui traduisent l'état d'altération du grain stocké.

C'est pourquoi, dans le travail entrepris, nous avons attaché un intérêt tout particulier à la mise au point du protocole expérimental, et avons effectué une étude critique aussi bien des conditions d'entreposage expérimental que des méthodes de mesure des déterminations biochimiques envisagées.

A la recherche de critères d'altération aussi sensibles que possible, nous avons choisi deux nouveaux tests : la mesure de l'activité RNA-asique et la mesure du temps moyen de germination, pour suivre leur comportement dans des conditions d'entreposage représentatives des conditions pratiquées en Europe.

De plus, afin de situer ces tests et d'établir des relations entre certains des travaux antérieurs, nous avons suivi parallèlement l'évolution de tests déjà utilisés (capacité germinative, acidité "grasse", méthodes microbiologiques) et de caractéristiques technologiques en relation plus directe avec l'utilisation finale de la farine issue des blés ainsi stockés.

Ce sont ces différents aspects que nous allons développer dans les chapitres suivants.

CONDITIONS EXPERIMENTALES

1- MATERIEL BIOLOGIQUE ETUDIE.

Cinq lots de blé, provenant de la région parisienne, ont été utilisés pour nos essais. Quatre, récoltés en 1965, 1968, 1969 et 1970 sont de variété Cappelle ; le cinquième, récolté en 1967, est constitué d'un mélange renfermant 80 % de cette variété.

Ces lots ont d'abord été stockés en silo aéré à température ambiante (15-20°C) et à une hydratation moyenne de 16 % S.S., les quatre premiers pendant 4 mois, le cinquième pendant 19 mois.

Dès réception au laboratoire, ces blés ont été nettoyés, puis, à l'aide d'un échantillonneur conique (°), homogénéisés et divisés par dichotomies successives en lots de 4 à 5 kg. Ces échantillons réduits, conservés à 7°C, constituent les lots "témoins".

2- TECHNIQUE DE STOCKAGE EXPERIMENTAL.

2-1- Etude des enceintes de stockage expérimental.

2-1-1- Principe de régulation.

Le principe de régulation retenu est celui décrit par GAC (1955) et repris par MULTON et GUILBOT (1967 - 1968 a) (fig. 3).

L'air est saturé par barbotage dans l'eau sous une pression absolue P réglée à l'arrivée par le détendeur c. Grâce au détendeur h, la pression absolue de l'air est ramenée au niveau de la pression atmosphérique H, et la pression partielle p_s de vapeur saturante de l'eau dans l'air prend alors une valeur p. Selon les lois de Dalton :

$$\frac{H}{P} = \frac{p}{p_s} = H.R.$$

L'H.R. ne dépend donc que de la pression absolue de saturation ; elle est indépendante de la température.

(°) Echantillonneur CNTA - type HD22 (répondant à la norme AFNOR V.03.700).

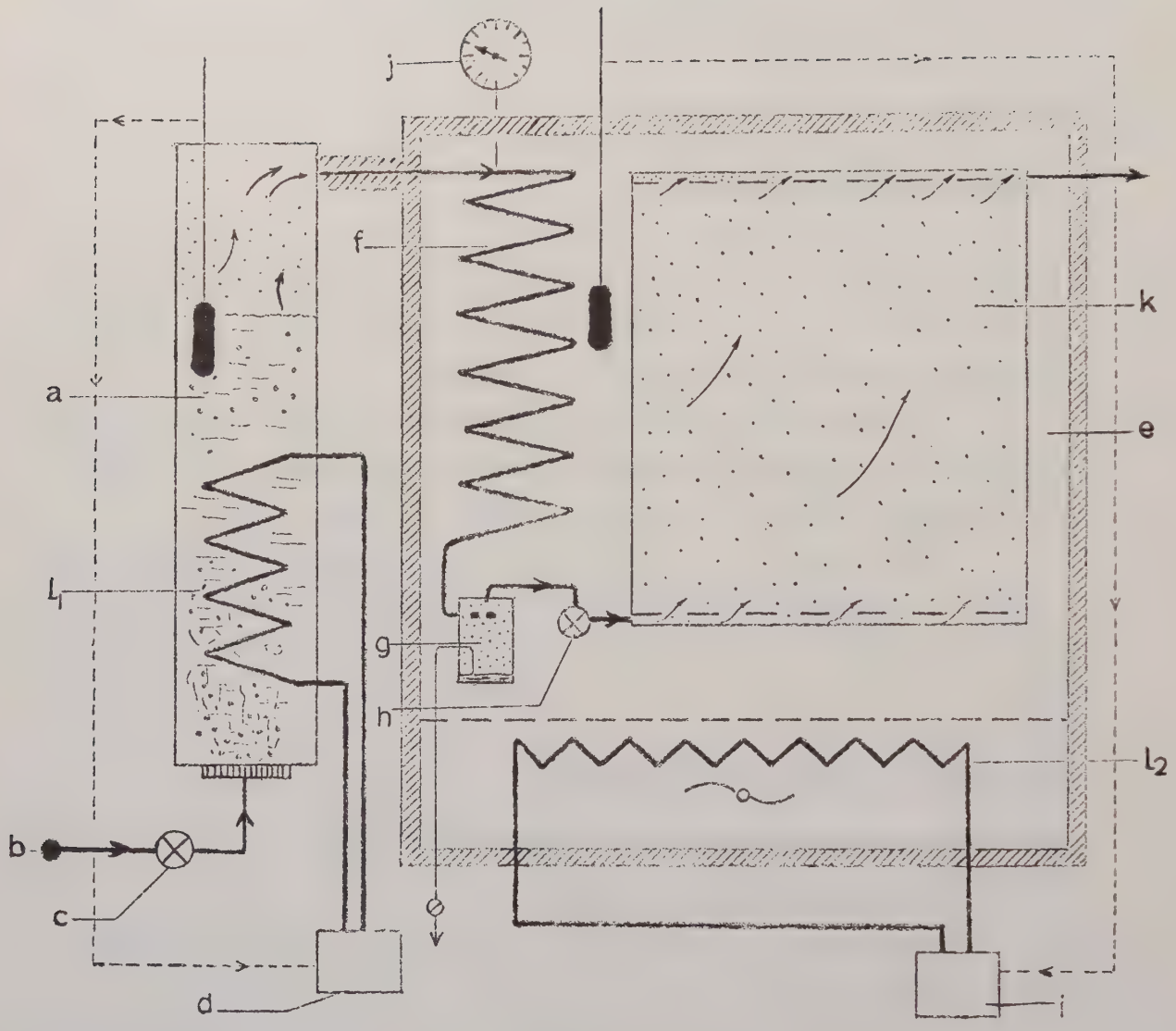


Fig. 3 : Schéma montrant le dispositif de conditionnement d'air de l'étuve à sorption d'eau (a, saturateur ; b, arrivée d'air ; c, premier détendeur ; d et i, relais de commande ; e, enceinte thermostatée ; f, condenseur ; g, fiole de récupération ; h, deuxième détendeur ; I_1 et I_2, résistances de chauffage ; j, manomètre ; k, enceinte conditionnée).

2-1-2- Réalisation pratique.

L'étuve ayant servi aux essais de stockage, et construite au laboratoire sur ce principe de régulation, comporte pour une même température, maintenue constante, cinq cellules indépendantes ; dans chacune d'entre elles, l'humidité relative, réglable entre 50 p. 100 et 98 p. 100, est maintenue constante (fig. 4).

L'étuve, dont la température est réglée uniquement par chauffage à l'aide d'une résistance très longue, est placée dans une pièce isotherme dont la température est légèrement inférieure à celle fixée dans l'étuve.

Dans chaque cellule, on peut disposer environ 2,5 kg de grains, répartis dans une dizaine de sachets en nylon à mailles fines. Ces sachets sont suspendus à des croisillons animés d'un mouvement de rotation très lent (1 tour à la minute), afin d'assurer une répartition homogène de l'air conditionné dont le débit est de 350 l par heure, dans chaque cellule d'un volume approximatif de 30 litres.

2-1-3- Contrôle de la température et de l'humidité relative : H.R. régnant dans l'étuve (fig. 5).

Les températures sèches de l'enceinte conditionnée sont mesurées à l'aide de thermocouples Cuivre-Constantan associés à un potentiomètre électronique enregistreur (MECI).

La température de rosée de l'air est mesurée à l'aide d'un hygromètre électronique automatique (°) associé au même potentiomètre.

2-1-4- Etude de la précision de régulation.

Les avantages du système de régulation de l'H.R. résident surtout dans la rapidité du changement d'H.R. obtenu par un simple réglage de la pression et dans la très bonne précision de la régulation. En effet, compte tenu des fluctuations de la pression atmosphérique, MULTON et GUILBOT (1967) indiquent une incertitude de l'ordre de 1 % en valeur relative.

Cependant, à la longue, certains défauts de fiabilité de l'appareil sont apparus. Ainsi, après plusieurs mois de fonctionnement continu, les vérifications effectuées ont permis de déceler des variations

---

(°) Compagnie des Compteurs, type $HCPI/E_1$ AD 50.

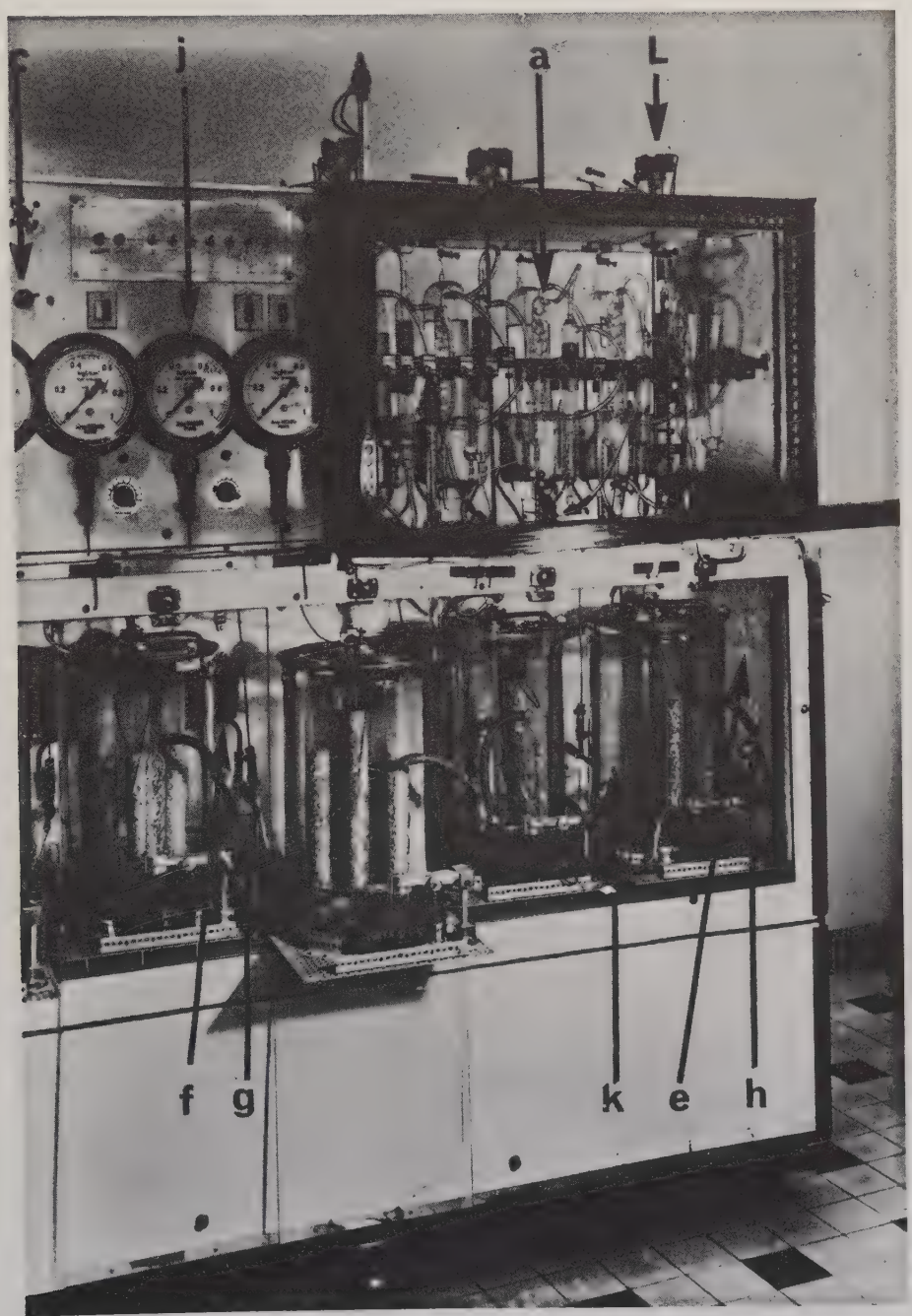


Fig. 4: Vue de l'appareil expérimental permettant de conserver du grain dans des conditions de température et d'humidité relative constantes et réglables, en atmosphère renouvelée. (a, batterie des cinq saturateurs; c, un des détendeurs; e, enceinte thermostatée; f, condenseur; g, fiole de récupération; h, deuxième détendeur; j, manomètre; k, enceinte conditionnée; l, moteur assurant la rotation des sachets)

supérieures à 1 %, semblant dues essentiellement au déréglage des manomètres. En outre, différentes pannes difficiles à déceler immédiatement (résistances chauffantes détériorées), ainsi que certains incidents indépendants de l'appareil (grèves de l'EDF, panne du compresseur d'air), ont fait que les humidités relatives ont fluctué entre des limites représentant des écarts supérieurs au 1 % normal. Le tableau II indique ces écarts pour les différents stockages expérimentaux effectués.

TABLEAU II - Fluctuations d'H.R. observées dans les cellules de stockage de deux appareils expérimentaux.

température de stockage en °C	H.R. théorique	limites maximales des écarts observés
30°	50	49-52
	60	61-63
	70	70-73
	80	80-84
	90	88-92
25°	75	76-80
	85	84-88
	95	91-97

Compte tenu de ces renseignements, nous avons apporté plusieurs modifications aux appareils existants, puis la fiabilité du système a été contrôlée, au cours d'un stockage de 594 jours. Six séries de mesures effectuées tous les 100 jours environ ont permis de confirmer l'amélioration du fonctionnement (Tableau III).

TABLEAU III - Analyse des fluctuations de H.R. observées pendant 594 jours dans trois cellules d'un appareil expérimental de stockage régulé à +25°C.

numéro des cellules	1	2	3
Nombre de mesures	6	6	6
Moyenne de l'H.R.	$97,3_7$	$86,9_5$	$80,1_9$
Coefficient de variation(%)	0,73	2,20	2,18

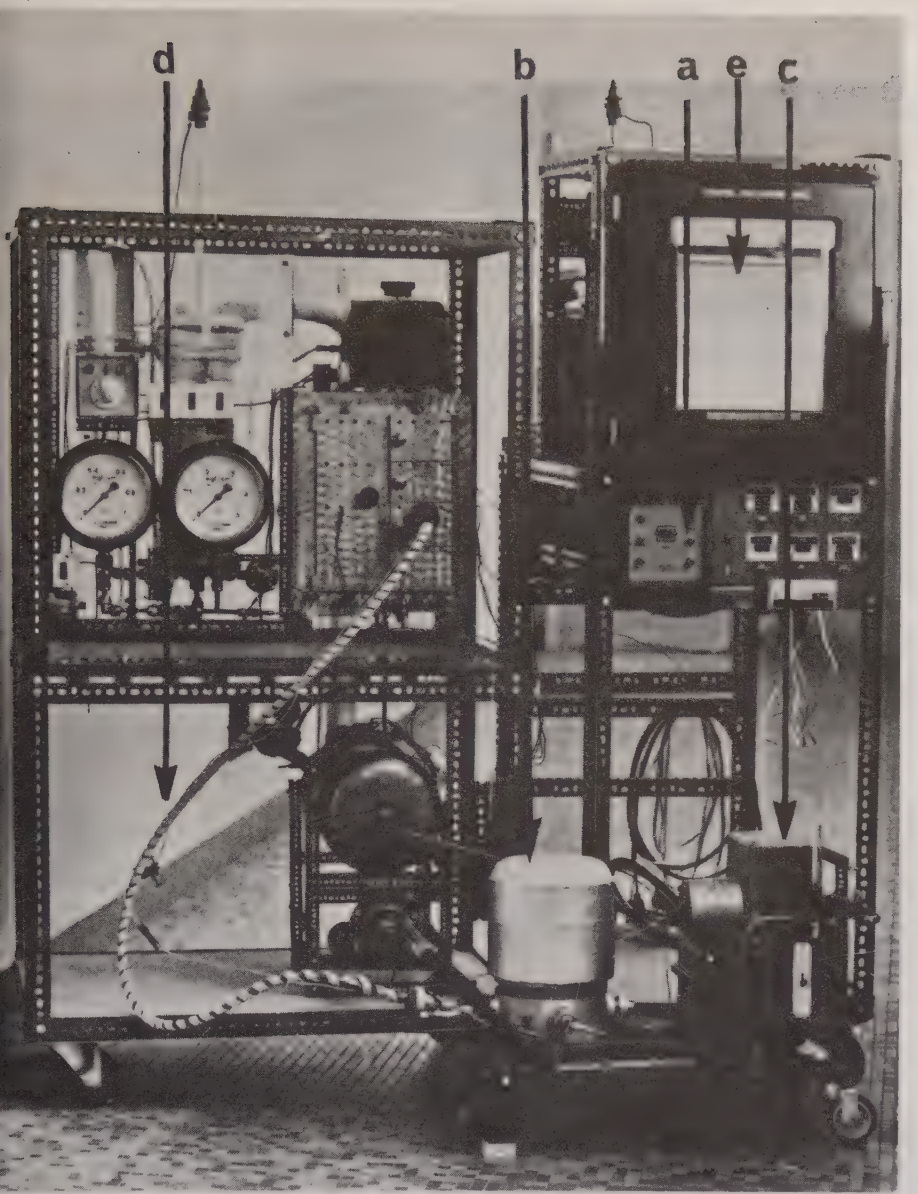
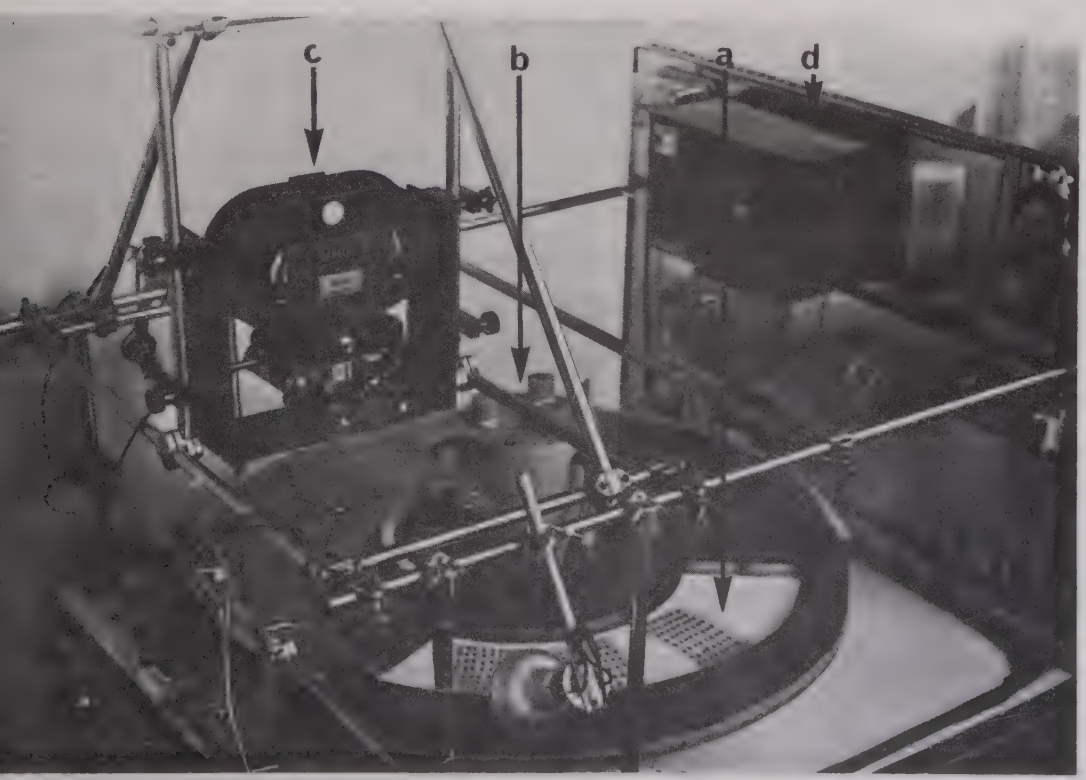


Fig.5

Vue d'ensemble de l'appareil de mesure de sorption et de contrôle. d'humidité relative (a,dispositif électronique de l'hygromètre; b, cloche de l'hygrométre; c, pompe; d, tuyauen teflon; e, potentiométre enregistreur).

Fig.6

Photographie montrant une vue d'ensemble de l'appareil d'enregistrement de la germination des grains. (a, lot de 100 grains sur le plateau de germination par l'intermédiaire de papier Whatman; b, dispositif de vase de Mariotte; c, appareil de photo; d, dispositif de commandes électroniques: relais de la cellule photo-électrique, chrono-relais, combinateur).



2-2- Détermination du temps moyen de germination : Tm

2-2-1- Principe et description de la méthode

La méthode utilisée pour cette étude (MULTON et al., 1968 - MULTON, 1969 a) consiste à suivre l'évolution du nombre de grains germés en fonction du temps de germination. Pour cela, un appareil automatique d'enregistrement photographique (fig. 6) a été mis au point (c). Il permet de suivre simultanément jusqu'à 14 échantillons de 100 grains (a) en les photographiant à des intervalles de temps constants, mais réglables (les intervalles choisis sont en général d'une ou deux heures).

Les grains (a) sont disposés sur des germoirs comportant un système d'alimentation automatique en eau distillée (b) ; le potentiel capillaire est réglable grâce à un dispositif basé à la fois sur le système du vase de Mariotte et sur le phénomène de succion capillaire du papier recouvrant le germoir. L'ensemble de l'appareil est placé dans une enceinte isotherme (20 $\pm$ 1°C), à l'obscurité, le seul éclairage étant celui nécessaire aux prises de vue.

La lecture des films obtenus permet de compter le nombre de grains germés en fonction du temps écoulé, l'instant zéro étant celui où les grains sont placés sur le germoir. On considère comme germé tout grain dont la radicule a percé les enveloppes et s'est allongée de façon décelable sur la photo. Cette définition très subjective a été retenue pour des raisons pratiques, bien que, physiologiquement, elle ne corresponde pas à un étape précise de la germination.

On établit la distribution de fréquence des durées de germination, et l'on en calcule la moyenne(Tm) et la variance.

Il faut noter que le Tm mesuré, étant relatif à la population des grains vivants, n'a d'intérêt que si la C.g. est suffisamment élevée. Dans le cas contraire, la mesure beaucoup plus simple de la C.g. suffit à rendre compte de l'altération des grains.

2-2-2- Etude critique de la méthode.

2-2-2-1- Influence de la position des semences sur le germoir.

Le début de la germination n'est pas homogène et varie selon la position des semences sur le germoir comme le montre l'expérience suivante.

22 échantillons comportant chacun 100 grains de blé rangés en 10 lignes et 10 colonnes ont été mis en germination, le germe dirigé vers le centre du plateau et le grain reposant sur la surface humide du germoir par sa face portant le sillon.

A un instant t, correspondant globalement à environ 30% de grains ayant déjà germé, on a décompté ces derniers, ligne par ligne, en cumulant les dénombrements des 22 échantillons : la fig. 7 représente l'histogramme des fréquences de germination correspondant à chaque ligne. Il apparaît que les grains germent d'autant plus précocement qu'ils sont situés plus loin de l'axe de rotation du plateau.

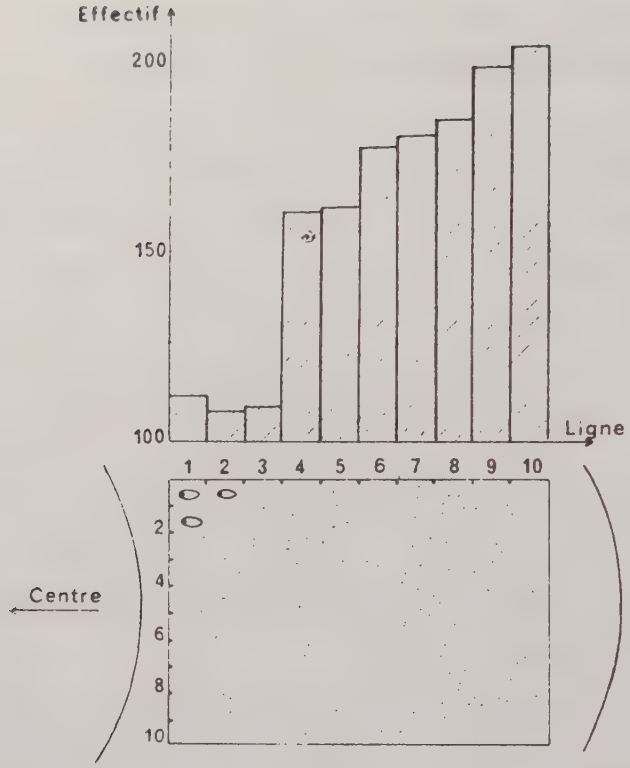


Fig. 7 : Histogramme montrant les fréquences de germination relatives à chaque ligne de l'échantillon de blé (l'histogramme est établi à partir de 22 échantillons à un instant correspondant à environ 30 % de grains ayant déjà germé).

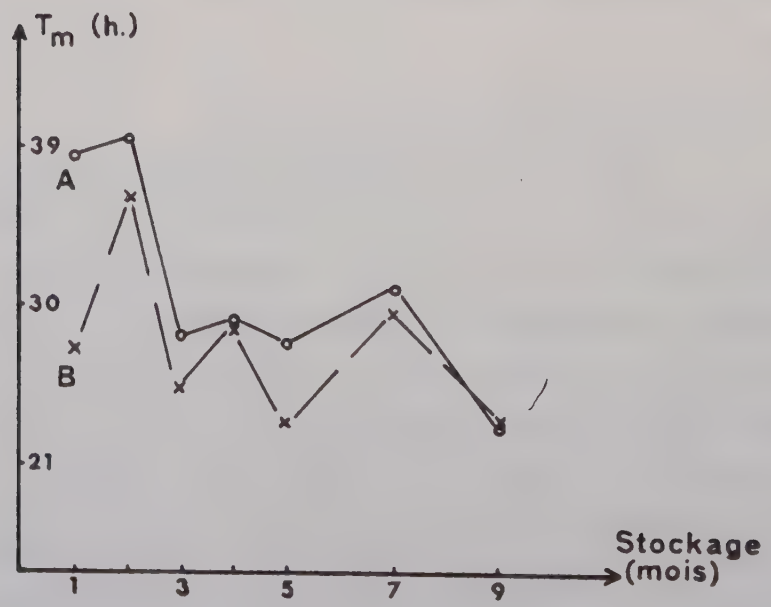


Fig. 8 : Fluctuations du Tm de blé variété Cappelle récolté en 1968 et conservé à +7°C à 16 % SS d'hydratation.
(A) o lectures dispersées dans le temps
(B) x lectures groupées le même jour

L'explication de ce phénomène reste à préciser ; plusieurs hypothèses peuvent être envisagées : un défaut de planéité des germoirs qui rendrait le potentiel capillaire plus élevé à la périphérie, un effet de force centrifuge, ou une autre cause non déterminée.

2-2-2-2- Influence de l'époque de lecture du film et évolution du blé témoin.

Sur la fig. 8, nous avons porté le temps moyen de germination du blé témoin en fonction de la durée de stockage. Dans le premier cas (courbe A), chaque film a été lu au fur et à mesure de la réalisation des essais (la première et la dernière lecture étant ainsi espacées de 8 mois), et, dans le deuxième cas (courbe B), les films ont été lus le même jour. L'examen de cette figure amène trois observations :

- La "reproductibilité"propre d'un lecteur va en s'améliorant au fur et à mesure qu'il est plus expérimenté (la courbe A est presque confondue avec la courbe B pour les dernières mesures).
- Toutefois, le lecteur tend à considérer le grain comme "germé" de plus en plus tôt (les déterminations de la courbe B sont d'ordonnées moins élevées que pour la courbe A) ; le Tm_t mesuré tend donc à diminuer.
- Il semble exister une corrélation entre le Tm_t et la durée de stockage du blé témoin. Cette corrélation n'est cependant pas significative, le nombre de mesures étant très limité (5 d.d.l.). Quoi qu'il en soit, les fluctuations du Tm du blé témoin stocké en chambre froide sont assez importantes (23 à 39 heures), ce qui montre la nécessité absolue de disposer d'un échantillon témoin à chaque mesure.

2-2-3- Reproductibilité des résultats.

Afin d'apprécier la reproductibilité des résultats obtenus, plusieurs expériences ont été effectuées pour mettre en évidence l'influence :

- de l'opérateur, qui introduit un facteur subjectif d'appréciation personnelle ;
- des fluctuations d'échantillonnage des semences.

Naturellement, ces essais intègrent également les fluctuations dues à l'appareil lui-même, et dont certaines causes viennent d'être analysées.

2-2-3-1- Reproductibilité du Tm au cours de plusieurs lectures (influence du lecteur).

Celle-ci a été évaluée de la façon suivante (MULTON et al., 1968) : un même film a été relu 10 fois, par un même opérateur entraîné, à des espaces de temps relativement courts (10 à 15 jours).

Le test d'homogénéité (comparaison des moyennes) ne laisse apparaître aucune différence significative. Pour une valeur de la moyenne générale de 34, 40 heures, l'écart-type est de 0,32, ce qui représente un coefficient de variation (v = 100 s/m, rapport de l'écart-type à la moyenne) inférieur à 1 p. 100, soit une excellente reproductibilité de la lecture quand elle est effectuée dans les conditions définies ci-dessus.

Les différences importantes que l'on observe entre plusieurs lecteurs peuvent être éliminées à l'aide d'un facteur correctif, ou par étalonnage mutuel.

Ces remarques conduisent aux conclusions suivantes :

- un même lecteur fournit des résultats présentant une excellente reproductibilité, quand il opère au cours d'une période assez courte ; il convient donc qu'une série d'expériences comparatives soit lue aussi rapidement que possible par un même lecteur ;
- les Tm des différents échantillons à étudier doivent être systématiquement rapportés à celui du témoin, une lecture en valeur absolue étant délicate à interpréter ;
- il est nécessaire de conserver un film de référence afin de permettre à l'opérateur de suivre l'évolution de ses appréciations et de pouvoir comparer les résultats obtenus à différentes époques ; le film étalon permet également d'accorder les appréciations de différents opérateurs.

2-2-3-2- Reproductibilité du Tm mesuré sur différents échantillons d'un lot homogène (fluctuation d'échantillonnage).

Cette reproductibilité a été évaluée en enregistrant simultanément l'évolution de la germination d'une série d'échantillons d'un même lot de grains, les films étant lus par un même lecteur.

Il n'est pas apparu de différences significatives, pour autant que les réglages de niveau d'eau soient précis et identiques pour chaque germoir (ce qui est obtenu par la connection en série des régulateurs).

Dans ces conditions, il a été observé sur une série de 6 échantillons une valeur moyenne de Tm de 33,27 heures, avec un écart-type de 1,035 ; le coefficient de variation est, dans ce cas, de l'ordre de 3 p. 100.

2-2-3-3- Reproductibilité du rapport de deux Tm.

Ainsi qu'on le verra, on considère le plus souvent non pas le Tm en valeur absolue, mais sa valeur rapportée à celle d'un lot témoin ; une analyse de reproductibilité a été faite dans ces conditions.

Différents échantillons et leur témoin ayant été prélevés dans un même lot homogène, le même opérateur a procédé au dépouillement des films dans le minimum de temps, et a ainsi calculé les Tm des échantillons rapportés à ceux de leur témoin.

Sur 11 déterminations, la moyenne (de Tm essai/Tm témoin) est de 1,09, et l'écart-type $5,2 \times 10^{-2}$, ce qui représente un coefficient de variation de 4,76 p. 100 (on vérifie que le coefficient de variation des Tm pris en valeur absolue est de l'ordre de 3 p. 100, valeur identique à celle indiquée précédemment).

2-2-4- Conclusion.

L'étude critique de la méthode d'appréciation de la viabilité des grains par la mesure du temps moyen de germination montre finalement une bonne reproductibilité malgré les éléments subjectifs de l'appréciation en matière de "germination". Sa sensibilité en fait une méthode de choix pour déceler les altérations subies par le grain.

2-3- Dosage de l'acidité "grasse".

Le dosage de l'acidité "grasse" consiste essentiellement à titrer par volumétrie l'acidité extraite dans des conditions définies ; les variantes de cette méthode diffèrent surtout par le choix du solvant qui est fonction du type d'acidité à extraire :

- l'alcool à 67°GL extrait, outre les acides gras, les phosphates acides et les acides aminés ; ces derniers peuvent être dosés sélectivement en ramenant le titre de l'alcool à 85° GL après avoir neutralisé le milieu (FOREMAN, 1920 ; LINDENBERG et GARY-BOBO, 1956 ; GUILBOT, 1960);
- l'alcool à 95°GL extrait surtout les acides gras et certains autres acides organiques tels que l'acide lactique ;

- l'éther de pétrole est très sélectif pour l'extraction des acides gras supérieurs.

En 1971, un essai comparatif international de deux méthodes de détermination d'acidité dans les farines de blé a été réalisé dans le cadre de l'I.C.C. La première méthode, définie par PELSHENKE et al.(1964), préconise l'extraction de l'acidité par l'alcool à 67°GL ; pour la seconde, l'extraction est effectuée par l'éther de pétrole selon la méthode A.A.C.C. (1962). La mesure de la répétabilité de cet essai montre des différences hautement significatives. En outre, l'accroissement de l'acidité mesurée selon ces deux méthodes, et qui se produit lors du stockage de la farine à une teneur en eau de 14 % S.H. et à température du laboratoire, montre une évolution identique. Il apparaît donc que, dans les limites des conditions expérimentales, ces deux méthodes définissent globalement les fluctuations d'acidité d'une manière très identique.

Pour nos essais, il a été utilisé la méthode définie par le C.N.E.R.N.A. (1958) qui comporte essentiellement, d'une part, l'extraction par l'alcool à 95°GL à partir de blé entier broyé avec un moulin à café, d'autre part, le titrage de l'acidité de l'extrait à l'aide de soude N/20.

Les résultats sont exprimés en milliéquivalents ou degrés d'acidité (cm^3 de solution alcaline normale) pour 100 g de substance sèche.

L'analyse de la reproductibilité des résultats, obtenue dans ces conditions, montre un coefficient de variation de l'ordre de 15 %.

C'est en définitive la plus grande facilité d'extraction associée au fait que l'évolution relative des résultats reste comparable qui nous a conduits à adopter la méthode C.N.E.R.N.A.

2-4- Détermination quantitative de la population microbienne des grains.

En l'absence de méthode de référence, et en raison de la répartition très hétérogène des micro-organismes sur les grains de blé et de la présence toujours possible d'une microflore interne, il a été nécessaire d'adapter au cas du blé la méthode classique du dénombrement des micro-organismes par dilutions successives (POISSON et CAHAGNIER, 1963).

2-4-1- Préparation de la suspension microbienne.

Cette méthode consiste à verser aseptiquement 50 g de grains (pesés à 10 mg près) et 200 g d'un diluant stérile (Cl Na : 9 g ; bacto peptone Difco : 1 g ; Tween 80 : 0,033 g ; eau distillée q.s.p. : 1000 cm^3;

pH 7) dans le bol en acier inoxydable du mixer "Waring Blendor" ; après 20 à 30 minutes de trempage, temps nécessaire pour revivifier les micro-organismes, les grains sont broyés pendant 2 mn (à la vitesse de 12.500 tours/mn, la température de la suspension ne s'élève pas de plus de 3°C); enfin, après un repos de 30 secondes, la suspension est homogénéisée par agitation, puis diluée 10, 100, 1.000 fois ..., pour ensemencer les milieux de culture en boîte de Pétri.

2-4-2- Les milieux de culture.

Les milieux de culture permettant de révéler les différentes composantes floristiques des grains de blé sont choisis parmi ceux habituellement utilisés en bactériologie alimentaire (BUTTIAUX, 1968), en microbiologie des sols (POCHON et de BACJAC, 1958) et en microbiologie générale (CASSAGNE, 1961).

Les bactéries "ordinaires" ou mésophiles totales : aérobies et aérobies-anaérobies facultatives, sont dénombrées sur milieu "gélose-numération" composé comme suit (en g par 1 d'eau distillée) : peptone (6), extrait de levure (4), agar (14) ; le pH est de 7,2 et la stérilisation est effectuée à l'autoclave à 120°C pendant 20 mn. Au moment de l'ensemencement des boîtes de Pétri, on ajoute au milieu de culture un antifongique : l'actidione, ce qui permet d'éviter la prolifération des levures. En outre, certaines bactéries formant des colonies très envahissantes, il est utilisé la technique de la double couche pour limiter leur surface. Le dénombrement des colonies est effectué après une incubation de 72 h à 30°C.

Les bactéries coliformes sont dénombrées sur un milieu rendu sélectif par addition de désoxycholate de sodium. La composition de ce milieu exprimée en g par 1 d'eau distillée est la suivante : peptone (10), lactose (10), désoxycholate de sodium (1), ClNa (5), PO_4HK_2 (2), citrate de fer (1), agar (15), rouge neutre (0,03). Le pH du milieu est de 7. Le milieu est coulé en deux temps (double couche) ; la durée d'incubation est de 24 h à 30°C.

Pour révéler le plus grand nombre possible des éléments de la flore fongique, levures et moisissures incluses, il est indispensable d'utiliser différents milieux dont l'extrait de malt constitue l'élément de base. En outre, le milieu Czapek 350,réalisant une pression osmotique élevée, permet de mettre en évidence certains groupes de moisissures osmophiles et osmotolérantes, tels que A. glaucus spp., et d'éliminer les

micro-organismes qui gênent le développement des autres groupes. L'incorporation d'antibiotique (streptomycine - pénicilline) est indispensable pour inhiber la multiplication des bactéries.

Le milieu malt de pH 7 est composé en g par l d'eau distillée de : maltea Moser (20) et agar (14) ; la stérilisation à l'autoclave est faite à 120°C pendant 20 mn, et les durées d'incubation sont de 4, 7 et 12 j à 24°C. De même, le milieu Czapek 350 de pH 7,3 est composé de : gélose (15), saccharose (35), nitrate de sodium (2), PO_4HK_2 (1), sulfate de magnésium (0,5), ClK (0,5) et sulfate de fer (0,01) ; la stérilisation à l'autoclave dure 30 mn à 104°C et la durée d'incubation est de 12 j à 24°C.

2-4-3- Expression des résultats.

Les résultats sont donnés en nombre de colonies microbiennes développées sur milieu de culture à partir d'un gramme de blé analysé. Pour nous conformer aux usages admis, nous désignerons ce nombre de colonies formées par "nombre de moisissures" (de bactéries, ou de levures).

CAHAGNIER (1971), dans l'étude critique détaillée qu'il fait de la méthode du dénombrement des micro-organismes par dilutions successives appliquées au cas du maïs, indique que les coefficients de variation du dénombrement des bactéries, des levures et des moisissures, sont respectivement de 15, 15,7 et 12,7 %.

2-5- Description des tests technologiques utilisés.

L'appréciation de la qualité des blés met en jeu un ensemble de techniques qui permettent de définir l'aptitude du blé à fournir un produit fini offrant des caractéristiques déterminées. Or, cette notion est fonction, d'une part, de l'emploi auquel on destine le blé, et d'autre part, de notions subjectives reliées, par exemple, à la valeur technologique et alimentaire. Ces considérations nous ont amenés à choisir deux tests : l'alvéographe Chopin et la semi-micropanification, qui permettent d'effectuer des sondages représentatifs soit d'un aspect particulier, soit de l'aspect global, de la valeur boulangère des blés soumis aux stockages expérimentaux (BURE, 1961).

2-5-1- La mouture du blé.

La farine nécessaire aux tests technologiques est obtenue par broyage du blé dans un moulin de laboratoire (°).

PERRET et POMA (1963), CAGNAC (1964) ont montré qu'il est possible d'obtenir des résultats très comparables à ceux de la mouture industrielle, aussi bien du point de vue panification que du point de vue caractéristiques analytiques (alvéographe, cendres, protéines, amylographe, granulation) moyennant :

- une adaptation des cylindres et des garnitures du plansischter,
- un conditionnement précis des blés à une teneur en eau de 15,5 $\pm$ 0,1%S.H.

2-5-2- L'alvéogramme Chopin.

L'alvéogramme Chopin permet, selon CHOPIN (1921) : "d'établir une relation simple et générale entre la faculté que possède une pâte de farine de s'étendre en membrane mince, et le volume spécifique du pain susceptible d'être obtenu avec cette farine, cette relation permettant de prédéterminer d'une façon exacte et rapide la valeur boulangère d'une farine". L'alvéogramme Chopin est un diagramme dont les caractéristiques essentielles : P, G et W renseignent respectivement sur la ténacité de la pâte, l'aptitude à donner un pain bien développé et la force boulangère du blé (CHOPIN, 1968 ; I.T.C.F., 1970).

Nous avons effectué (tableau IV) le calcul statistique de reproductibilité des données de P, G et W d'après les résultats des circuits d'analyse B.I.P.E.A. En outre, nous avons reproduit les résultats publiés par BOURDET et LECLERCQ (1970) correspondants à une moyenne des coefficients de variation des caractéristiques P, G et W obtenus par plusieurs séries d'analyses sur un même échantillon et par différents laboratoires européens.

(°) "Quadrumat Senior" de Brabender (1964).

TABLEAU IV : Analyse de la reproductibilité des caractéristiques de l'alvéogramme Chopin selon les données publiées par le B.I.P.E.A. et BOURDET et LECLERCQ (1970).

(a) moyenne de 2 séries de 20 résultats et de 3 séries de 11 résultats ;
(b) " 3 " " " 2 " " "

Données			Moyenne	Coefficient de variation %
Origine		Nombre		
P				
- selon B.I.P.E.A. (1971)	-mars	46	90,26	9,83
	-avril	29	55,76	14,74
	-mai	40	48,62	12,57
	-juin	31	44,03	6,77
- selon BOURDET et LECLERCQ		(a)		12
G				
- selon B.I.P.E.A. (1971)	-mars	46	25,63	6,58
	-avril	29	25,43	4,58
	-mai	40	24,99	5,22
	-juin	31	25,02	4,99
- selon BOURDET et LECLERCQ		(b)		7
W				
- selon B.I.P.E.A. (1971)	-mars	46	379,69	11,47
	-avril	29	200,00	11,05
	-mai	40	160,85	8,64
	-juin	31	142,77	8,25
- selon BOURDET et LECLERCQ		(a)		16

Il apparaît que la reproductibilité de la méthode, appréciée au moyen du coefficient de variation, est bonne pour un test rhéologique.

2-5-3- La semi-micro-panification.

Un essai de cuisson standardisé a été mis au point par POMA et LAUNAY (1967) beaucoup plus en vue d'une étude analytique que de la recherche d'aptitudes technologiques optimales des farines. Le but est de déceler des différences de comportement entre les échantillons en les soumettant à un processus de panification expérimental standardisé. Cet essai est donc particulièrement adapté à l'étude de l'évolution des farines extraites de blé soumis à diverses conditions de stockage ou de séchage.

Tous les stades de l'essai ont été soigneusement définis pour assurer une bonne reproductibilité des résultats, en particulier :

- une formule de pâte à hydratation constante (eau totale : 84 % S.S.) ;
- le pétrissage, d'une durée de 8 mn, est réalisé dans le pétrin de 300 g du Farinographe Brabender ;
- la première et la seconde fermentation sont effectuées à 27°C et à une H.R. de 90 %, dans une étuve à hygrométrie régulée selon le principe précédemment décrit pour les enceintes de stockage (cf. page 37) ;
- les pâtons sont "tournés" dans la bouleuse de l'Extensographe Brabender;
- la cuisson, en moules, est effectuée dans un four Chopin (modèle [illegible]) à injection de vapeur.

Les qualités technologiques de la farine sont appréciées au cours de cet essai à l'aide de trois critères objectifs : la consistance de la pâte en fin de pétrissage, la perte de poids et le volume spécifique du pain après cuisson.

Le coefficient de variation qui affecte les déterminations est de l'ordre de 3 %.

Les auteurs de cette méthode ont voulu remplacer chaque fois qu'il était possible les appréciations subjectives habituelles par des indications chiffrées objectives données par des appareils de laboratoire. Mais, à notre avis, il ne faut pas écarter les renseignements d'ordre organoleptique qui, bien que subjectifs, font en grande partie l'intérêt du test de panification (GUINET et NEIGE, 1965), d'autant plus que l'utilisation de méthodes statistiques rigoureuses permet une interprétation valable des tests subjectifs.

2-6- Méthode de dosage de l'activité RNA-asique dans les céréales.

2-6-1- Description de la méthode (MULTON, 1969, b).

Le principe du dosage repose sur l'extraction des protéines solubles par une solution de force ionique déterminée, suivie d'une purification partielle de la RNA-ase par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium. L'activité RNA-asique de l'extrait est alors déterminée par dosage spectrophotométrique des oligonucléotides acido-solubles libérés par action de l'enzyme sur un substrat ARN.

La fig. 9 résume les principales étapes du mode opératoire.

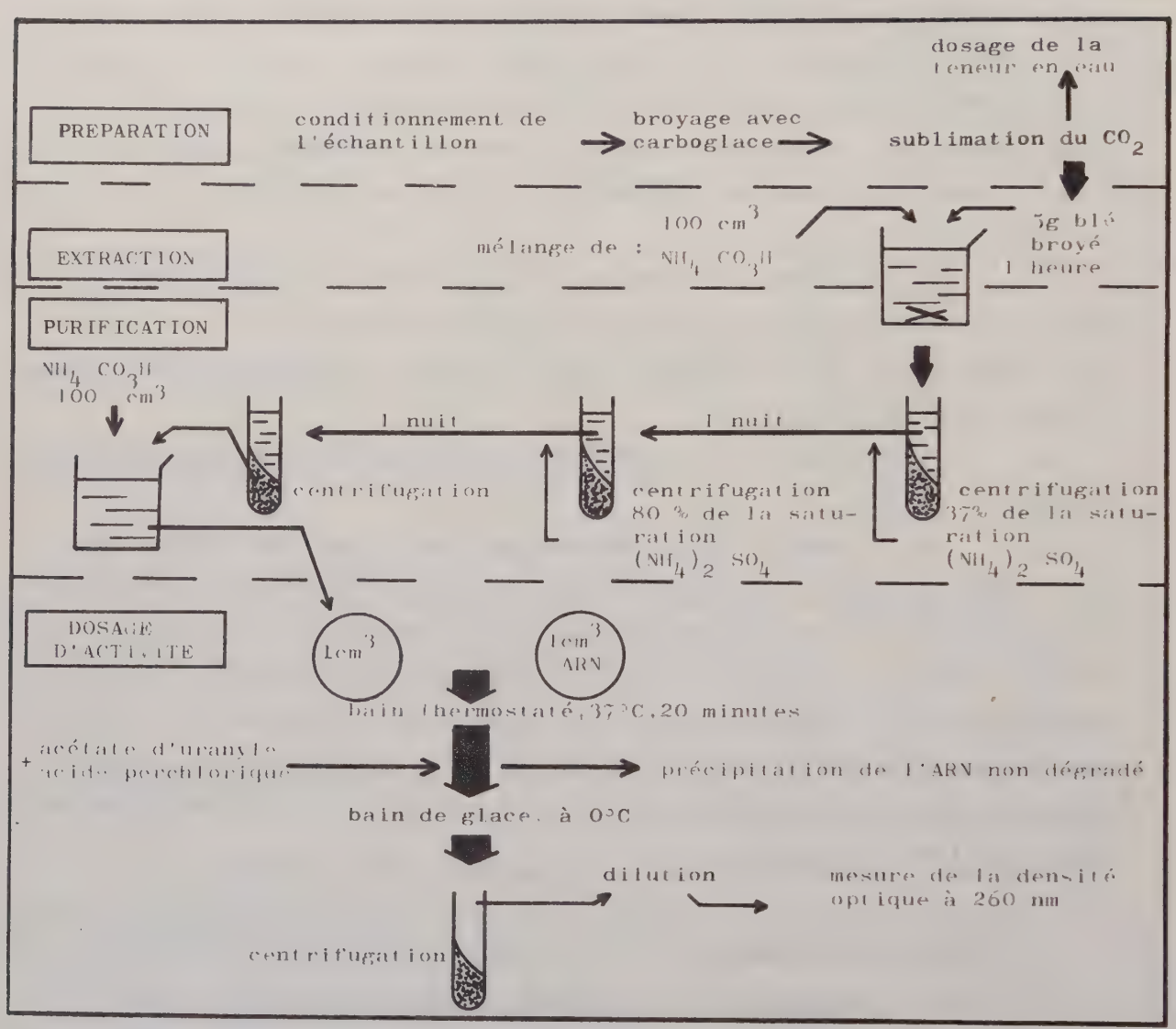


Fig. 9 : Dosage de l'activité RNA-asique extractible du grain de blé : schéma résumant les principales étapes du mode opératoire.

2-6-1-1- Préparation des échantillons à analyser.

Environ 20 g de grains préalablement ramenés à une hydratation de 14-16 % S.S. sont broyés avec de la carboglace qui a pour rôle d'éviter tout échauffement risquant de dénaturer les protéines du grain. Les dimensions des particules du broyat obtenu doivent être d'une taille telle que 99,5 % passent à travers un tamis de maille 0,5 mm. La poudre obtenue est maintenue 12-14 heures à +7°C, afin de permettre la sublimation du CO_2.

2-6-1-2- Extraction de la RNA-ase.

L'extraction est effectuée pendant une heure en mettant en suspension 5 ± 1 mg de broyat dans 100 cm^3 d'une solution de bicarbonate d'ammonium 0,5 M à + 7°C, avec une agitation manuelle intermittente. Le milieu d'extraction ainsi constitué est sensiblement tamponné à pH 8 pour l'ensemble des opérations ultérieures de précipitations fractionnées. Le reste du broyat sert à effectuer un dosage d'eau par étuvage à 130°C pendant 2 heures (GUILBOT, 1968).

2-6-1-3- Purification de la RNA-ase.

L'extrait est, après centrifugation à 3.500 F.C.R. (°) pendant 30 mn et à 0°C, précipité en deux étapes. Une première précipitation effectuée au moyen d'une solution de $SO_4(NH_4)_2$ 0,37 saturée (μ = 4,8) permet d'éliminer une grande partie des pentosanes et des protéines de PM élevé. Une deuxième précipitation avec le même sel, mais en solution 0,80 saturée (μ = 6,6) permet de précipiter les protéines de P M moins important, donc la majeure partie de la RNA-ase.

Ces deux précipités sont obtenus après centrifugation à 3.500 F.C.R. pendant 45 mn à 0°C. Le second précipité est dissous au moyen de 100 cm^3 de bicarbonate d'ammonium 0,01 M amené à pH 7 par quelques gouttes d'acide acétique 0,1 N.

2-6-1-4- Dosage d'activité de la RNA-ase.

On met en présence 1 cm^3 d'extrait et 1 ± 0,01 cm^3 de substrat à 37 ± 0,2°C pendant 20 mn ± 5 s.

Le substrat est constitué par une solution d'ARN de levure à 1 % dans un tampon acétate-acide acétique de pH 5 qui est le pH optimum de la RNA-ase de blé.

(°) Selon LOISELEUR (1963), la force centrifuge relative donnée est celle qui se produit au milieu du volume de l'extrait à centrifuger dans le tube. A titre indicatif, dans ce cas, les F.C.R. extrêmes qui s'exercent sur le milieu sont de 4.080 et 3.000 F.C.R.

La réaction enzymatique est bloquée en ajoutant 1 cm^3 d'acétate d'uranyle (0,75 % en solution dans de l'acide perchlorique à 25 %) et en plaçant le tube réactionnel dans un bain à 0°C. Le réactif utilisé offre l'intérêt d'associer à un pH très acide qui inactive l'enzyme, un sel de métal lourd qui précipite l'ARN non dégradé et qui, en outre, présente une faible absorption dans l'U.V.

La température du bain de 0°C a un rôle complémentaire d'inactivation de l'enzyme dont l'activité optimum se situe à 55°C.

La réaction enzymatique étant bloquée, on centrifuge à 0°C pendant 30 mn à 23.500 F.C.R. (les F.C.R. extrêmes sont de 19.200 et 27.740). Seuls, les oligonucléotides restent en solution. On mesure alors la densité optique du surnageant qui est fonction de la concentration en oligonucléotides acidosolubles libérés par la RNA-ase.

L'absorption U.V. mesurée à 260 nm est due aux bases azotées.

Nous appelons "témoin" la mesure effectuée sur l'extrait RNA-asique de grains du même lot de blé qui n'ont subi aucun traitement, conditionnement, ou choc thermique. Le lot de grains de ce témoin est conservé à + 7°C.

Le "blanc" est constitué par un essai réalisé avec 1 cm^3 d'extrait enzymatique du "témoin" et l'ARN, mais dont on bloque immédiatement la réaction en ajoutant au temps zéro l'agent précipitant et en plaçant le tube à 0°C. L'absorption U.V. mesurée dans ces conditions est celle propre à l'extrait, à l'ARN, à l'agent précipitant et à la cuve de mesure.

L'activité RNA-asique est exprimée par la mesure de la densité optique du surnageant après dilution convenable : si d est la D.O. d'un blé traité, d_t celle du blé "témoin" et d_b celle du "blanc", on exprime les résultats par la relation:

$$\frac{d - d_b}{d_t - d_b}$$

Les D.O. sont rapportées à la matière sèche de la prise d'essai.

2-6-2- Etude critique et remarques portant sur les différentes étapes du mode opératoire.

2-6-2-1- La préparation des échantillons à analyser.

- Le broyage :

Nous avons effectué des essais de broyage, sans pré-séchage, d'échantillons de blé contenant de 18 à 25 % d'eau S.S. ; aucune différence significative d'activité RNA-asique rapportée à la matière sèche n'a

été observée, à condition d'effectuer rapidement et au même moment les prélèvements destinés aux dosages de l'activité et de l'eau.

La répartition de dimensions des particules est un facteur important dans les conditions d'extraction employées. Ce facteur a été étudié en mesurant l'activité extractible de fractions broyées à différents réglages d'un moulin BÜHLER (tableau V).

TABLEAU V - Activité RNA-asique extractible mesurée à partir de broyats d'un même blé. Ces broyats sont effectués selon différents réglages du moulin BÜHLER.

Réglage du moulin	% passant à travers le tamis à 0,5 mm	Activité (D.O.)	% diminution D.O. par rapport au réglage/0
0	99,54	0,580	-
1	97,72	0,545	6
3	69,31	0,458	21
5	25,87	0,430	26

Cet essai montre qu'il est important de contrôler périodiquement la dimension des particules du broyat, afin de mettre en évidence un éventuel déréglage du broyeur utilisé.

La reproductibilité du broyage est analysée dans le tableau VI. Cinq broyages ont été effectués au cours d'une période de 315 jours avec un broyeur BÜHLER de même modèle que celui précédemment employé, mais neuf, sur un même échantillon de blé conservé à 7°C et à une teneur en eau de 13,5 % S.S.

TABLEAU VI - Analyse de la reproductibilité du broyage de blé à teneur en eau de 13,5 S.S. Les broyages sont effectués selon différents réglages du moulin BÜHLER. Ils sont au nombre de 5 faits à 315 jours d'intervalle, sauf pour la moyenne marquée d'un astérisque, qui a été obtenue à partir de quatre broyages effectués à 136 jours d'intervalle.

positions de réglage du moulin	moyenne du % passant à travers un tamis de 0,5mm	coefficient de variation %
0	71,68	11,84
0	68,19 *	1,7
1	56,14	22,47
3	33,28	21,16
5	21,88	13,00

La comparaison de ces deux tableaux montre que, d'un broyeur à un autre cependant de modèle identique, les caractéristiques varient de façon importante.

En outre, l'observation du tableau VI montre que pendant une période de l'ordre de 100 jours, le coefficient de variation est faible, mais que sur de longues périodes il devient plus élevé.

En conclusion, on peut dire que le facteur dimension des particules est particulièrement important. Le problème est en outre moins facile à résoudre qu'on ne le pense, car il faut obtenir un broyage fin et sans échauffement.

- La conservation du blé broyé :

L'expérience suivante met en évidence l'influence du mode de conservation du broyat. Le tableau VII résume les conditions de préparation et de conservation de différents échantillons ; parallèlement à un lot de blé témoin conservé entier à 7°C et une teneur en eau de 16 % S.S., 3 lots de blé ayant subi différents traitements d'humidification et de séchage sont conservés broyés à + 5°C et à - 15°C. Périodiquement, entre le 11e et 502e jour de stockage, des prélèvements sont effectués dans les 4 lots et l'activité RNA-asique est dosée.

Les résultats étant exprimés par rapport à la valeur du témoin conservé en grains en chambre froide, quel que soit le mode de stockage (réfrigérateur ou congélateur), il n'a pas été observé de corrélation entre la durée de stockage et le rapport d'activité RNA-asique ($r = 0,20$; $r\ 5\ \% = 0,48$).

On peut en conclure que si l'activité RNA-asique d'un broyat de blé conservé à +5°C ou à -15°C et aux teneurs en eau de 12 à 17 % S.S. varie dans le temps, cette variation d'activité suit celle du blé témoin conservé en grains en chambre froide (+7°C) et à 16 % S.S.

Cette observation nous permettra une plus grande latitude pour la conservation du blé en grains entiers ou broyés, peu ou pas conditionnés. Cependant, il serait imprudent de généraliser, avant vérification préalable, à un blé qui a subi des traitements plus importants susceptibles de le détériorer.

TABLEAU VII - Conditions de préparation, de conservation et de dosage d'activité RNA-asique, de différents échantillons de blé issus d'un même lot initial ayant subi différents traitements d'humidification et de séchage, en parallèle avec le lot témoin initial.

Préparation des échantillons	Modes de stockage des échantillons	Broyage	Dosages périodiques
Blé témoin entier (hydratation 16 % S.S.)	Chambre froide (+ 7°C)	+	+
Blé témoin (hydratation 16 % S.S.) broyé	Réfrigérateur (+ 5°C)	-	+
	Congélateur (- 15°C)	-	+
Blé séché (12 % S.S.) broyé	Réfrigérateur (+ 5°C)	-	+
	Congélateur (- 15°C)	-	+
Blé hydraté (22 % S.S.) puis immédiatement séché (14 % S.S.) broyé	Réfrigérateur (+ 5°C)	-	+
	Congélateur (- 15°C)	-	+

2-6-2-2- Extraction et purification de la RNA-ase.

On observe sur la fig. 10 que, toutes choses égales par ailleurs, l'extraction de la RNA-ase est pratiquement totale après 5 heures de contact entre le solvant et le blé broyé, avec agitation intermittente. Néanmoins, pour simplifier le mode opératoire, on a été amené à limiter la durée d'extraction à 1 h, après avoir vérifié que l'on obtenait de façon reproductible 75 % de l'activité totale extractible.

2-6-2-3- Dosage d'activité de la RNA-ase.

Le temps de séjour dans le bain de glace avant la centrifugation a une faible incidence sur le résultat final : $\pm$ 2 % si le temps de séjour est compris entre 20 et 40 mn. Par contre, les conditions de centrifugation ont une grande répercussion sur les résultats obtenus (fig.11). Il importe de centrifuger au minimum 20 mn à 17.500 F.C.R. On ne peut, pour l'instant, expliquer avec certitude les phénomènes observés.

Un facteur de perturbation important réside dans l'état de polymérisation de l'ARN servant de substrat. En effet, l'ARN utilisé tend à se dépolymériser, soit à l'état lyophilisé, soit en solution stock. L'activité RNA-asique d'un échantillon est alors appréciée par excès, tout se passant comme si l'ARN déjà dépolymérisé était plus sensible à

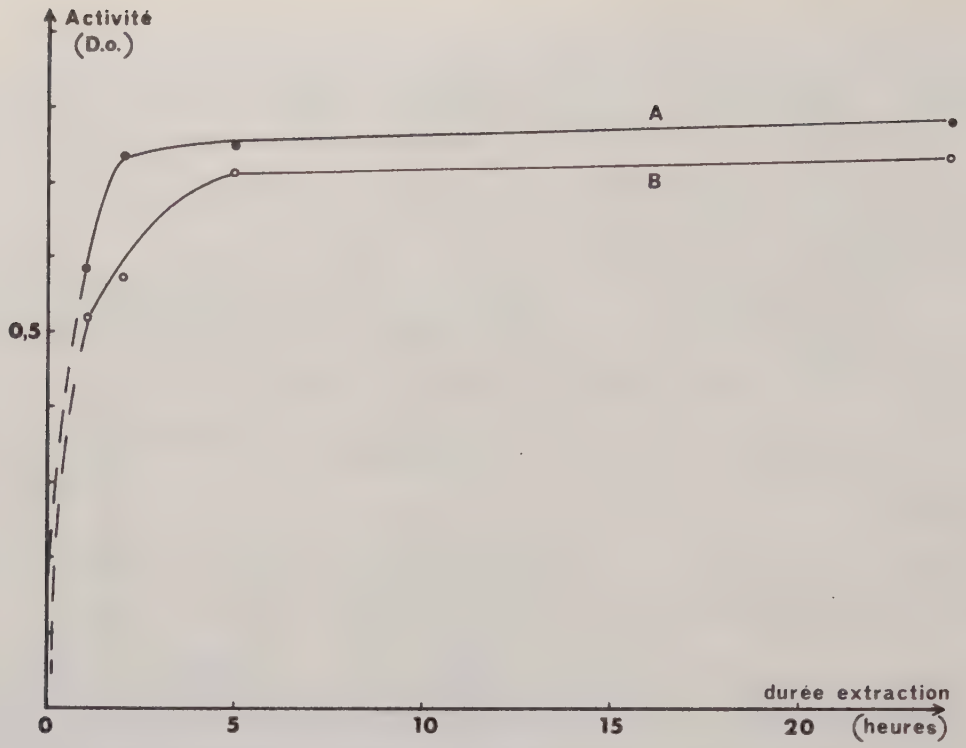


Fig. 10 : Activité RNA-asique de l'extrait de blé exprimée en densité optique en fonction de la durée d'extraction, avec agitation (A) et sans agitation (B).

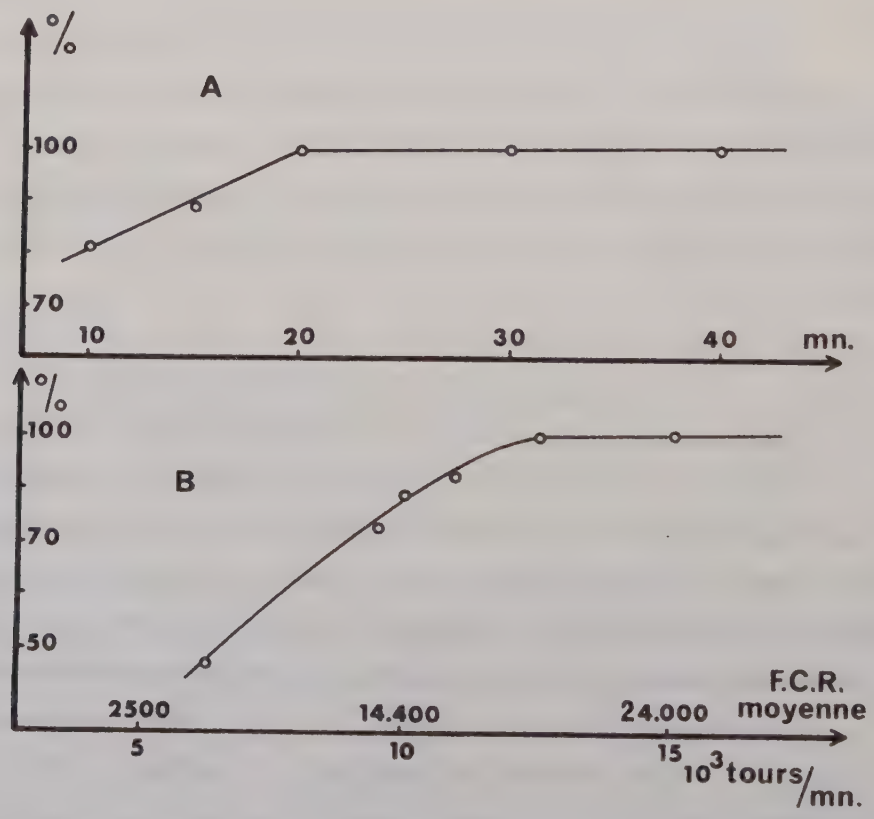


Fig. 11 : Variation de l'activité d'un extrait RNA-asique de blé, exprimée en % de la valeur maximale observée, en fonction des conditions de la centrifugation qui suit l'arrêt de la réaction enzymatique.
A : en fonction de la durée de centrifugation à 23.500 F.C.R.
B : " " vitesse " appliquée pendant 30 mn.

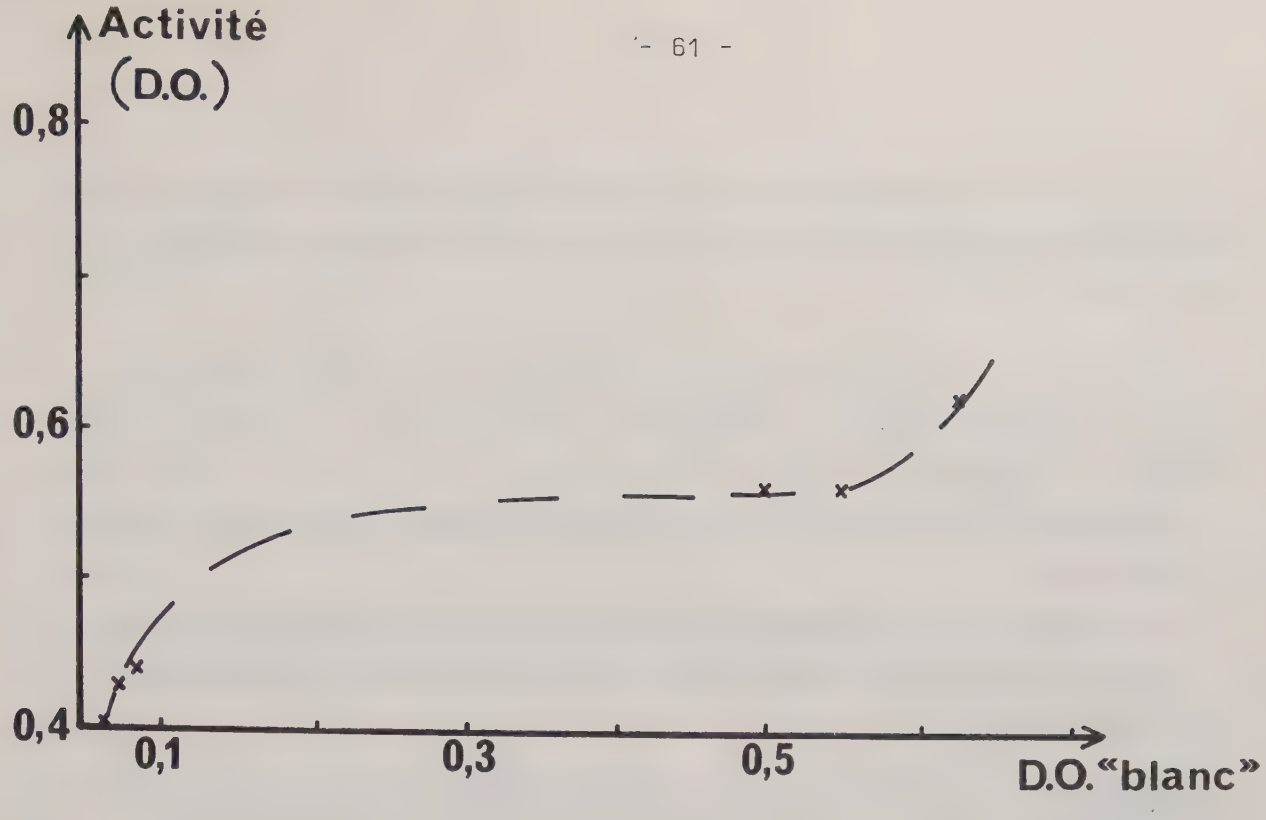


Fig. 12 : Fluctuations de l'activité RNA-asique d'un même extrait de blé, selon l'état de dépolymérisation du substrat ARN caractérisé par les D.O. du "blanc" obtenues lors de cette détermination.

l'attaque enzymatique. Dans ce cas, la valeur du"blanc" est plus élevée que d'habitude, ce qui constitue un signal d'alarme.

Ainsi, fig. 12, un essai a montré que la valeur du blanc ne doit pas dépasser 0,1 de D.O. pour une dilution finale au 1/30e et une solution d'ARN à 1 %.

Entre août et juillet 1971, les Ets CHOAY (Paris-France), auprès desquels nous obtenions l'ARN, ont arrêté sa fabrication. Après de nombreux essais, nous avons utilisé pendant cette période de l'ARN SIGMA (°). Bien que dans les deux cas l'ARN soit obtenu selon la méthode de CRESFIELD et al. (1955), l'ARN CHOAY s'est révélé de meilleure qualité dans nos conditions expérimentales. En effet, pour une même concentration en RNA-ase d'origine pancréatique et toutes choses égales par ailleurs, l'activité enzymatique est presque deux fois plus importante avec un substrat ARN CHOAY qu'avec un substrat SIGMA.

(°) SIGMA, Saint-Louis, U.S.A.

Le substrat ARN de levure obtenu selon la méthode de HOLLEY et al. (1961) n'a pu être utilisé, car il donne des résultats nettement moins satisfaisants.

2-6-2-4- Reproductibilité des résultats de la méthode.

MULTON (1969 b) a apprécié la répétabilité des résultats de la méthode à un double point de vue (tabl. VIII) :

- d'une part, (A) en effectuant une série de dosages sur un même extrait enzymatique ;
- d'autre part, (B) en réalisant les dosages sur des extraits différents issus d'un même échantillon de blé, afin d'apprécier l'influence de l'extraction.

TABLEAU VIII - Analyse de la répétabilité des résultats obtenus lors de la détermination de l'activité RNA-asique (selon MULTON, 1969 b).

A - Pour des dosages effectués sur un même extrait (erreurs dues au dosage uniquement).

B - Pour des dosages effectués à partir d'extraits différents d'un même échantillon de blé.

	Moyenne (en D.O.)	Nombre d'essais	Ecart type	Coefficient de variation %	Intervalle de confiance pour l'essai (5%)
A	0,555	10	$1,41 \times 10^{-2}$	2,54	$0,555 \pm 0,031$
B	0,555	18	$1,71 \times 10^{-2}$	3,08	$0,555 \pm 0,036$

Cet essai de répétabilité a été conduit dans les meilleures conditions possibles. En effet :

- les dosages ont été effectués simultanément avec la même solution d'ARN, avec les mêmes produits ;
- l'opérateur avait une grande expérience de ces dosages.

Lors des stockages expérimentaux, on s'est aperçu que, dans certains cas, l'activité RNA-asique exprimée par rapport à celle du témoin, est demeurée constante pour le blé Cappelle récolté en 1968. Nous avons utilisé ces résultats en les considérant issus d'une même population, pour mesurer la reproductibilité des résultats du dosage lors de nos essais. Les résultats sont corrigés par rapport au "blanc" et à la teneur en eau. On trouve sur le tableau IX l'interprétation statistique des

résultats obtenus par un opérateur qualifié, effectuant pour la première fois le dosage (A) et par un second opérateur à deux stades d'entraînement différents (B, puis C).

TABLEAU IX - Analyse de la reproductibilité des résultats de la méthode de détermination de l'activité RNA-asique pour des dosages effectués à partir d'extraits et de solutions stock d'ARN différents. Les dosages sont effectués à des époques éloignées les unes des autres, par diverses personnes.

A - Opérateur qualifié effectuant pour la première fois le dosage.

B, puis C - Second opérateur à des stades différents d'entraînement.

Opérateur	Nombre de dosages	Moyenne	Coefficient de variation
A	51	1,043	22,8
B	25	0,962	15,6
C	17	1,035	8,72

Les résultats reportés sur ce tableau permettent de dégager les remarques suivantes :

- l'analyse porte sur le rapport de deux activités ; les risques d'erreur sont donc cumulés par rapport aux résultats de l'analyse présentée par MULTON et qui portent directement sur l'activité ;
- l'analyse reflète les variations dues au vieillissement et aux changements des solutions d'ARN, de tampon, aux fluctuations de température ambiante ;
- l'influence de l'opérateur est très importante. En (C) par exemple, les résultats sont les meilleurs, car les dosages ont été effectués par un opérateur qui possédait bien la technique.

Toutes ces causes d'erreurs cumulées expliquent que, dans les conditions de notre essai, le coefficient de variation dans le meilleur des cas soit un peu plus élevé que celui indiqué par MULTON (de l'ordre de 4,5 % au lieu de 3,08 %, coefficients de variation ramenés à la même dimension).

2-6-3- Conclusion.

La méthode de dosage de l'activité RNA-asique extractible des céréales,dont nous venons de présenter la description et l'étude critique, permet d'effectuer, sous réserve des quelques modifications présentées, des dosages en série avec une reproductibilité et une sensibilité suffisantes pour les recherches entreprises. Elle rend compte d'une activité globale d'hydrolyse de l'ARN, à laquelle peuvent participer d'autres enzymes, la ribonucléase demeurant cependant le système le plus important.

2-7- Méthode d'extraction, de purification et de fractionnement des enzymes à activité nucléasique du grain de blé.

Le but recherché est de purifier la ou les enzymes présentes dans le blé qui dégradent l'ARN.

Pour cela, nous avons établi un protocole dont la première étape débute à partir de l'extrait obtenu dans les conditions précédemment décrites par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, où se trouve précipitée la quasi totalité de l'activité ribonucléasique du blé. Le mode opératoire (fig. 13) utilisé pour ces opérations est décrit ci-après.

2-7-1- Extraction.

Compte tenu de l'étude critique faite des conditions opératoires indiquées précédemment, nous avons constaté que le broyage avec carboglace est inutile dès l'instant où la teneur en eau du grain ne dépasse pas 20 % S.S. ; aussi, pour nos essais, l'utilisation de la carboglace a-t-elle été supprimée.

En outre, la durée d'extraction est portée à cinq heures, avec agitation manuelle intermittente (cf. fig. 10, page 60).

La concentration du bicarbonate d'ammonium a été réduite à 0,15 M correspondant à une force ionique de 0,45μ, ce qui favorise l'extraction (fig. 14).

On a vérifié que, dans ces conditions, il n'y a plus d'activité RNA-asique décelable dans le culot de centrifugation.

2-7-2- Premier stade de purification.

Ce premier stade de purification reprend sans modifier le mode opératoire retenu par MULTON (1969 b). En effet, il s'avère que dans les parties éliminées, c'est-à-dire le culot de centrifugation après saturation

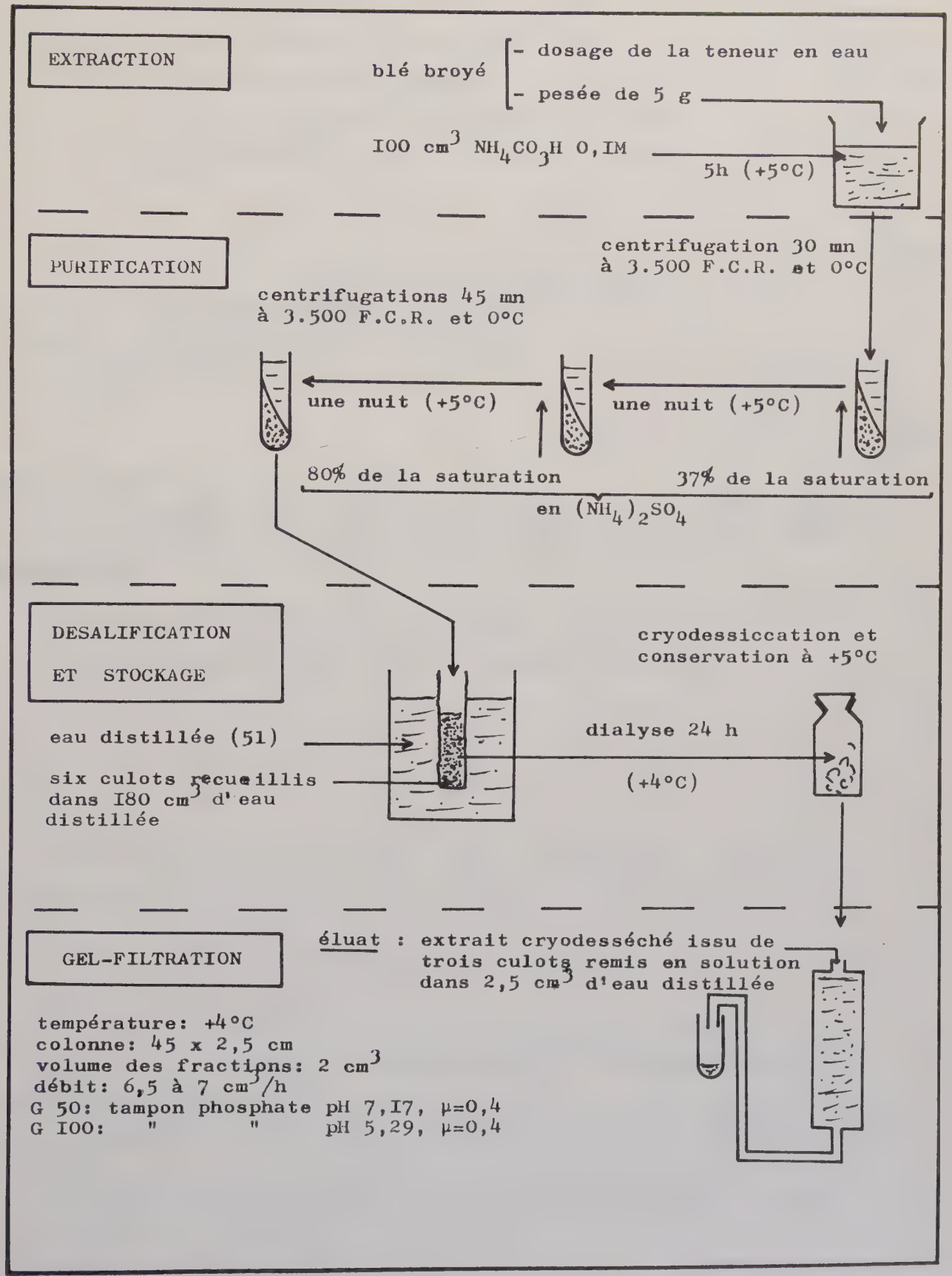


Fig. 13 : Extraction, purification, conditionnement et gel-filtration de la RNA-ase du blé : schéma résumant les étapes du mode opératoire.

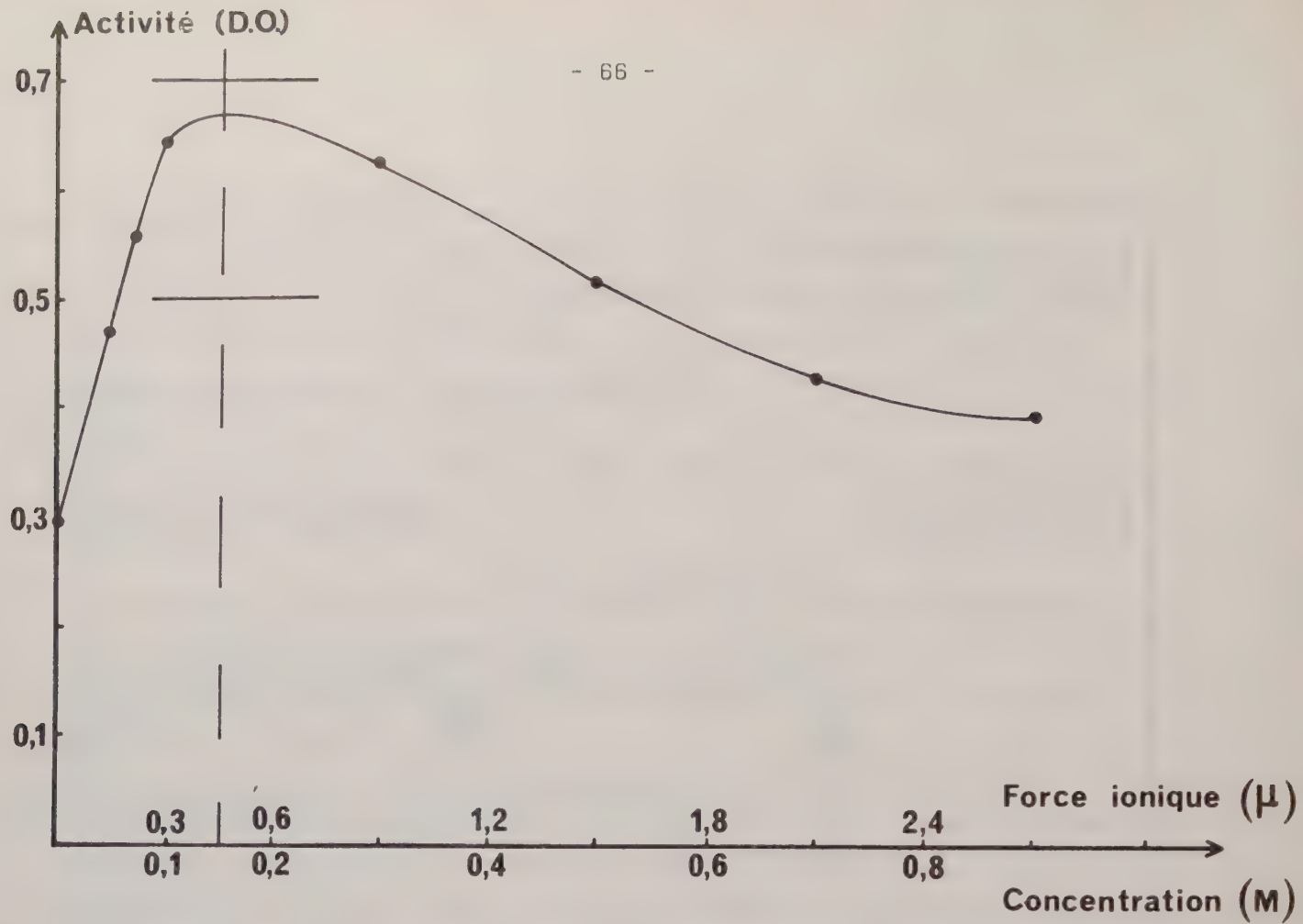


Fig. 14 : Activité RNA-asique de l'extrait de blé, exprimée en densité optique en fonction de la force ionique et de la concentration molaire du milieu utilisé pour l'extraction.

à 37 %, et le surnageant de centrifugation après saturation à 80 %, il n'est plus possible de mettre en évidence l'activité RNA-asique.

2-7-3- Désalification et concentration de l'extrait.

Après la précipitation à 80 % de saturation, le culot de centrifugation est recueilli dans 25 à 30 cm^3 d'eau distillée. Six culots sont réunis et dialysés pendant 24 heures à + 4°C, contre 5 l d'eau distillée. La dialyse est conduite dans des tubes en cellulose régénérée dont les pores de 24 Å laissent filtrer les composants azotés ne précipitant pas dans l'acide trichloracétique à 10 % ; la paroi des tubes secs est épaisse de 25 microns.

Après la dialyse, la solution enzymatique est cryodéshydratée et on obtient une substance blanche d'aspect floconneux, qui est conservée à +5°C en flacon hermétiquement bouché.

Après plusieurs mois de stockage à +5°C, la substance cryodessséchée ne présente pas de perte d'activité RNA-asique.

2-7-4- Gel-filtration.

2-7-4-1- Choix de la solution tampon.

Le tampon phosphate mono potassique - di sodique est utilisé pour la gel-filtration pour trois raisons :

- il permet d'obtenir une large gamme de pH, entre 5,29 et 8,04 (SOERENSEN, 1938) ;
- il n'affecte pas le dosage d'activité, contrairement au tampon Tris-HCl qui modifie la valeur du "blanc" de dosage ;
- il ne présente aucun danger et peut être manipulé sans précaution particulière, contrairement au tampon cacodylate de Na - HCl.

2-7-4-2- Choix du Sephadex.

Compte tenu des travaux antérieurs, nous avons choisi, pour une première étape, le Sephadex G50 médium qui permet une séparation des peptides et protéines dont le P M se situe entre 1.500 et 30.000. Les conditions expérimentales sont reportées sur la fig. 13. Cette manipulation nous a permis (cf. résultats obtenus) de vérifier qu'il n'apparaît pas de substance de faible P M présentant une activité RNA-asique.

Dans une seconde étape, nous avons effectué une filtration sur G 100, ce qui nous permet un fractionnement pour des substances dont le P M est compris entre 4.000 et 150.000.

2-7-5- Conclusion.

Les conditions opératoires que nous venons de décrire offrent les possibilités suivantes :

- une extraction très complète des enzymes présentant une activité nucléasique ;
- une méthodologie de purification et de désalification simple et qui n'écarte pas d'enzyme présentant une activité nucléolytique ;
- un mode opératoire reproductible jusqu'au stade de la cryodessiccation ;

- un mode de stockage de l'extrait sans perte d'activité ;
- une gel-filtration, première étape d'un fractionnement dont les étapes ultérieures feront intervenir des méthodologies plus complexes, qui devraient permettre d'obtenir les enzymes extraites à l'état pur.

3- PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

3-1- Description des stockages expérimentaux.

Plusieurs stockages expérimentaux ont été réalisés dans les enceintes précédemment décrites. Leurs caractéristiques sont schématisées dans le tableau X.

TABLEAU X - Schéma descriptif des stockages expérimentaux réalisés au cours de cette étude.

Repérage des essais		A	B		C
Durée (en j)		216	132		343
Blé utilisé	année de récolte	1968		1967	1968
	variété	Cappelle		80% de Cappelle	Cappelle
Température de stockage (°C)		30	25		
H.R. moyenne %	Cellule n° 1	90	94		97
	n° 2	82	86		87
	n° 3	71	78		80
	n° 4	62		94	
	n° 5	50		86	

Afin d'identifier plus aisément ces différentes expériences et les échantillons qui s'y rapportent, nous appellerons 68-30-90 le blé de variété Cappelle récolté en 1968, conditionné à + 30°C à l'H.R. de 88-92 % (H.R. moyenne de 90 %), et nous emploierons des notations identiques pour les autres modes de stockage, à savoir principalement :

- 68-30-80 : Cappelle 1968 à 30°C et à H.R. de 80-84 % (H.R. moy.: 90 %)
- 67-25-95 : " " 25°C " 91-97 % (H.R. " : 94 %)
- 68-25-97 : " " 25°C " $97,3_7$ %
- 68-25-87 : " " 25°C " $86,9_3$ %
- 68-25-80 : " " 25°C " $80,1_9$ %

Avant d'être placé dans les enceintes de stockage, le grain doit être amené par séchage ou humidification à une teneur en eau telle qu'il soit en équilibre d'H.R. avec l'atmosphère de l'enceinte. La quantité d'eau à retirer ou à ajouter est déterminée, connaissant la teneur en eau initiale du grain, l'H.R. et la température du stockage, grâce à la courbe de sorption du blé. Ces opérations sont réalisées de la façon suivante :

- Les opérations de séchage sont effectuées de manière très ménagée au moyen d'un appareil construit au laboratoire. Celui-ci est constitué d'une double enceinte fermée dans laquelle l'air est aspiré à travers les lots de grains, puis soufflé sur une solution saline saturée (sulfate de lithium) qui le déshydrate avant qu'il ne revienne au contact des grains. L'évolution du séchage est suivie par des pesées successives. Un échangeur thermique à circulation d'eau froide commandé par un thermostat avec relais a pour but de refroidir l'enceinte si nécessaire (température élevée au laboratoire, par exemple).
- L'humidification est effectuée directement par apport d'eau dans le récipient contenant le blé. Celui-ci est alors placé pendant 5 jours à + 5°C sur un dispositif d'agitation, afin d'assurer une bonne homogénéisation.

3-2- Etude critique du protocole expérimental.

Pour chaque stockage réalisé, un échantillon a été isolé afin de suivre l'évolution de sa masse pendant toute la durée de l'essai.

Les résultats les plus représentatifs ont été reportés sur la fig. 15.

L'analyse de l'essai C (tabl. XI), au cours de laquelle ont été précisées les variations de masse revenant aux pertes de matière sèche ou aux fluctuations de teneur en eau, a permis, en liaison avec les résultats reportés dans la fig. 15, de dégager les points suivants :

- les pertes de matière sèche sont d'autant plus importantes que l'H.R. est élevée ;
- le seuil de perte sensible de matière sèche semble se situer dans les conditions de l'essai, et compte tenu du stockage 68-25-95, vers une H.R. de l'ordre de 95 % ;

- si l'on considère qu'après approximativement 30 j de stockage, le blé se trouve en équilibre avec la cellule de conditionnement, et que la teneur en eau du blé lors du stockage 68-25-97 s'accroît (fig. 16), il apparaît que les modifications qui se produisent dans le grain aboutissent à un accroissement de l'affinité pour l'eau des constituants du milieu (grain et micro-organismes), aux H.R.E. très élevées.

TABLEAU XI - Fluctuations de teneur en eau (par rapport à la S.S.)et de masse de substance sèche de blés stockés à + 25°C, selon différentes H.R. et durées de stockage (essai de stockage C).

(a) : teneur en eau exprimée en % de S.S.

(b) : valeur du rapport $\left[(m_t - m_i) / m_i\right] \times 100$; avec m_t et m_i : quantités respectives de matière sèche après une durée t de stockage et à l'instant i, initial.

Durée de stockage en j \ H.R.	97		87		80	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
0	31,2	0	24,2	0	18	0
30	31,5	- 13,2	22,4	- 0,9	18,6	- 0,13
81	33,8	- 29,5	21,2	- 4,6	18,8	- 0,46
102	34,3	- 34,2	20,9	- 1,3	18,5	- 0,25
150	34,4	- 41,7	21,2	- 1,6	18,1	- 0,06
294	47,2	- 69,8	20,8	- 2,5	17,5	- 0,05
343	65,3	- 79,6	21,4	- 3,3	18,0	- 0,51

A la fin du stockage 68-25-95, nous avons mis en évidence une teneur en azote 2,71 fois plus élevée que pour le blé témoin, ce qui indique une diminution importante des glucides de réserve (amidon). Un phénomène identique a été observé dans le cas du maïs par LAGRANDEUR et al. (1968).

Aux H.R. plus basses, inférieures à 90 %, on observe (fig. 16) une certaine différence entre la courbe de sorption obtenue à partir des valeurs déterminées dans nos expériences et celle réalisée par la méthode

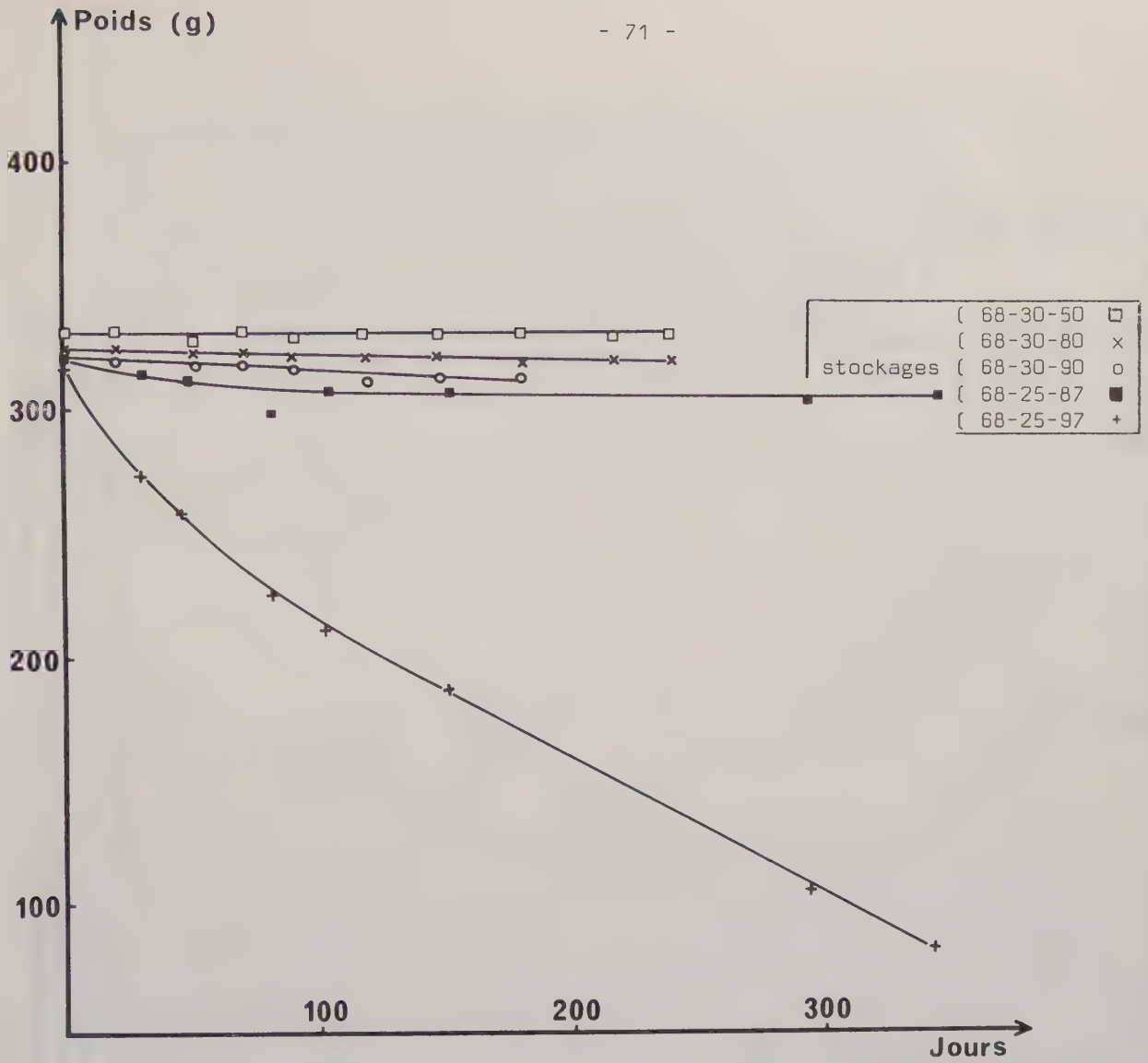


Fig. 15 : Fluctuations de masse d'une certaine quantité de blé humide selon les conditions expérimentales. Cette quantité de blé est variable selon les conditionnements.

décrite par DRAPRON et GUILBOT (1962) ; rappelons que celle-ci consiste à laisser le produit se mettre en équilibre avec une atmosphère dont l'H.R. est maintenue constante, sous un vide partiel, grâce à des solutions de H_2SO_4 convenablement titrées.

L'écart de 5°C existant entre les deux températures de sorption ne peut expliquer ces différences, l'affinité pour l'eau à 30°C étant normalement très légèrement inférieure à celle mise en évidence à 25°C.

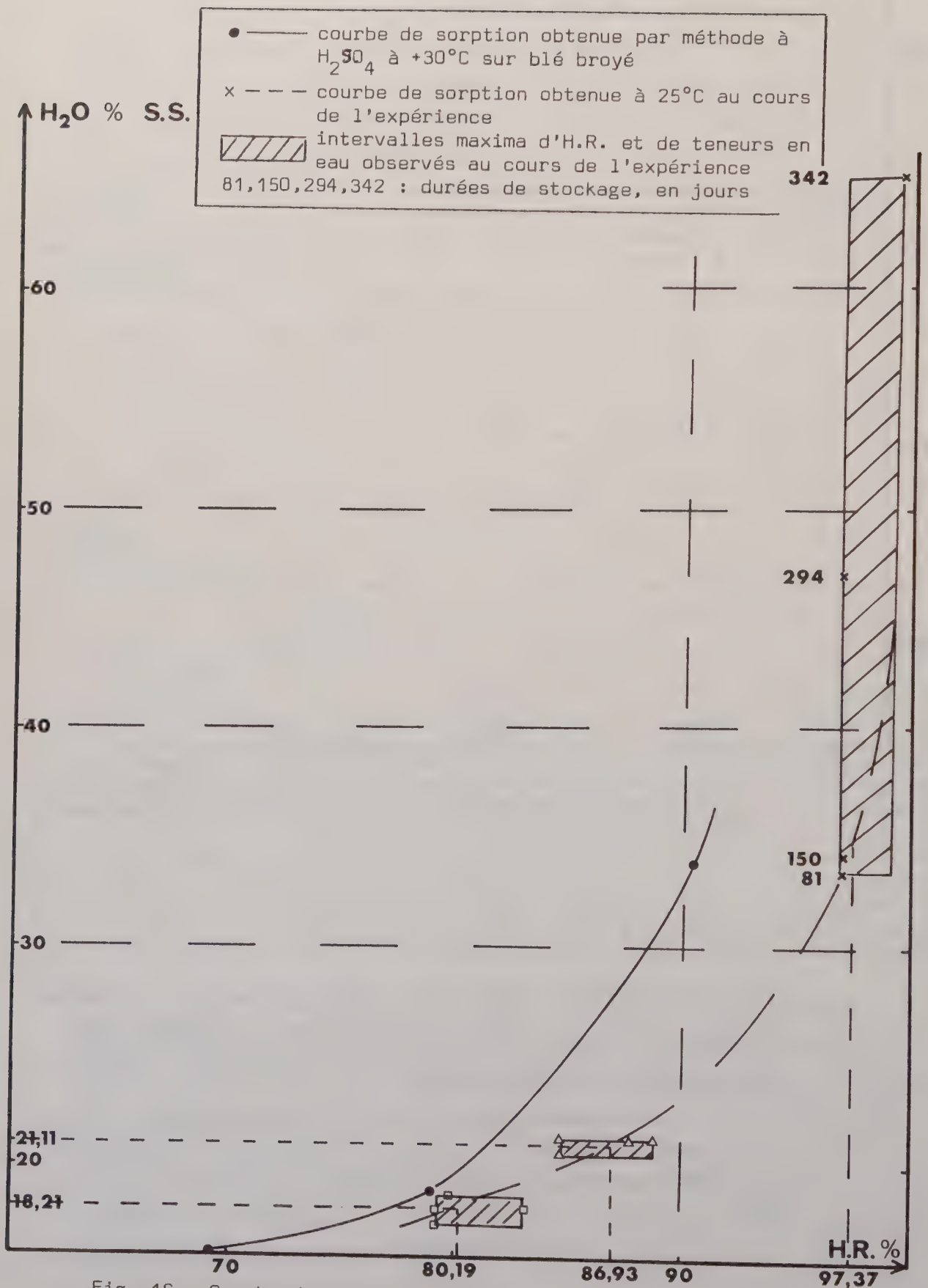


Fig. 16 : Courbe de sorption de blé, variété Cappelle, conditionné à + 30°C et +25°C.

Ce phénomène peut être attribué pour une partie au fait que l'équilibre hydrique est plus difficile à obtenir avec des grains entiers qu'avec du blé broyé (°). Nous avons cependant pris pour base la courbe que nous avions obtenue expérimentalement du fait qu'elle est plus représentative des conditions de stockage en pratique.

L'examen de la fig. 16 montre aussi la difficulté du préconditionnement aux hautes H.R. en raison de la pente très forte de la courbe de sorption.

3-3- Durée des stockages expérimentaux.

Le premier essai de stockage (A, cf. tableau X) s'est déroulé du 6 février 1969 au 10 octobre de la même année, soit pendant 216 jours, à + 30°C, sur blé de variété Cappelle récolté en 1968, aux H.R. précédemment définies (cf. caractéristiques du système de stockage expérimental pages 37 à 41), et dont les moyennes ont été reportées dans le tableau X.

Le second stockage (B) a duré du 2 juin 1969 au 10 octobre 1969, soit pendant 132 jours ; il a été mis en place selon un protocole défini comme pour l'essai A. Les facteurs année de récolte, humidité et température d'entreposage, ont été fixés d'une manière légèrement différente de ceux établis pour l'essai A afin de pouvoir infirmer ou confirmer les résultats expérimentaux préliminaires.

Le troisième essai (C) a été mis en place dans des conditions similaires à celles des essais A et B, du 13 avril 1970 au 23 mars 1971, soit pendant 343 jours.

La durée des stockages a été limitée par l'apparition et le développement du "pou des livres" ou psoque (famille des Liposcelidae ; BADONNEL, 1943 ; LEPIGRE, 1951), pour les deux premiers, et d'acariens pour le troisième.

(°) Par ailleurs, un phénomène identique s'observe avec d'autres substances, comme l'amidon, et seulement au-dessus d'H.R. de l'ordre de 75 %.

RESULTATS OBTENUS et DISCUSSION

Après avoir réalisé l'étude critique des méthodes et protocoles d'essais mis en oeuvre, nous avons proposé diverses améliorations des appareillages et des techniques utilisés, et aussi précisé les conditions expérimentales. L'ensemble de ces travaux vient d'être exposé dans le chapitre précédent.

La suite des recherches a consisté à soumettre différents lots de blé à des stockages expérimentaux, afin d'étudier leur évolution par mesure de l'activité RNA-asique et du temps moyen de germination, ainsi qu'à l'aide de tests classiques : population microbienne, acidité "grasse", alvéogramme Chopin et essai de cuisson.

Un examen critique des réponses à ces différents tests a été effectué pour apprécier leur validité, comparer leur intérêt et leur sensibilité, et établir éventuellement des corrélations entre eux.

Pour éliminer les fluctuations d'activité RNA-asique et de temps moyen de germination dues aux conditions de préparation, on a généralement exprimé ces valeurs par rapport à l'activité RNA-asique ou au Tm des lots de blé témoins conservés à + 7°C, soit respectivement A/A_t et Tm/Tm_t.

Or, il est apparu que l'activité RNA-asique du blé témoin fluctue considérablement. Ce fait a motivé une recherche plus approfondie portant sur la purification et l'isolement de la RNA-ase du blé afin de pouvoir tenter d'expliquer les phénomènes observés.

Ceci nous a conduits à distinguer dans ce chapitre les six parties suivantes :

- l'activité RNA-asique extractible, d'une part, du blé témoin et, d'autre part, au cours des stockages expérimentaux ;
- le temps moyen de germination et la capacité germinative ;
- l'évolution de l'acidité "grasse" libre ;
- l'évolution des micro-organismes,
- les caractéristiques technologiques de la farine issue du blé stocké ;
- la comparaison de ces tests pris deux à deux et dans leur ensemble.

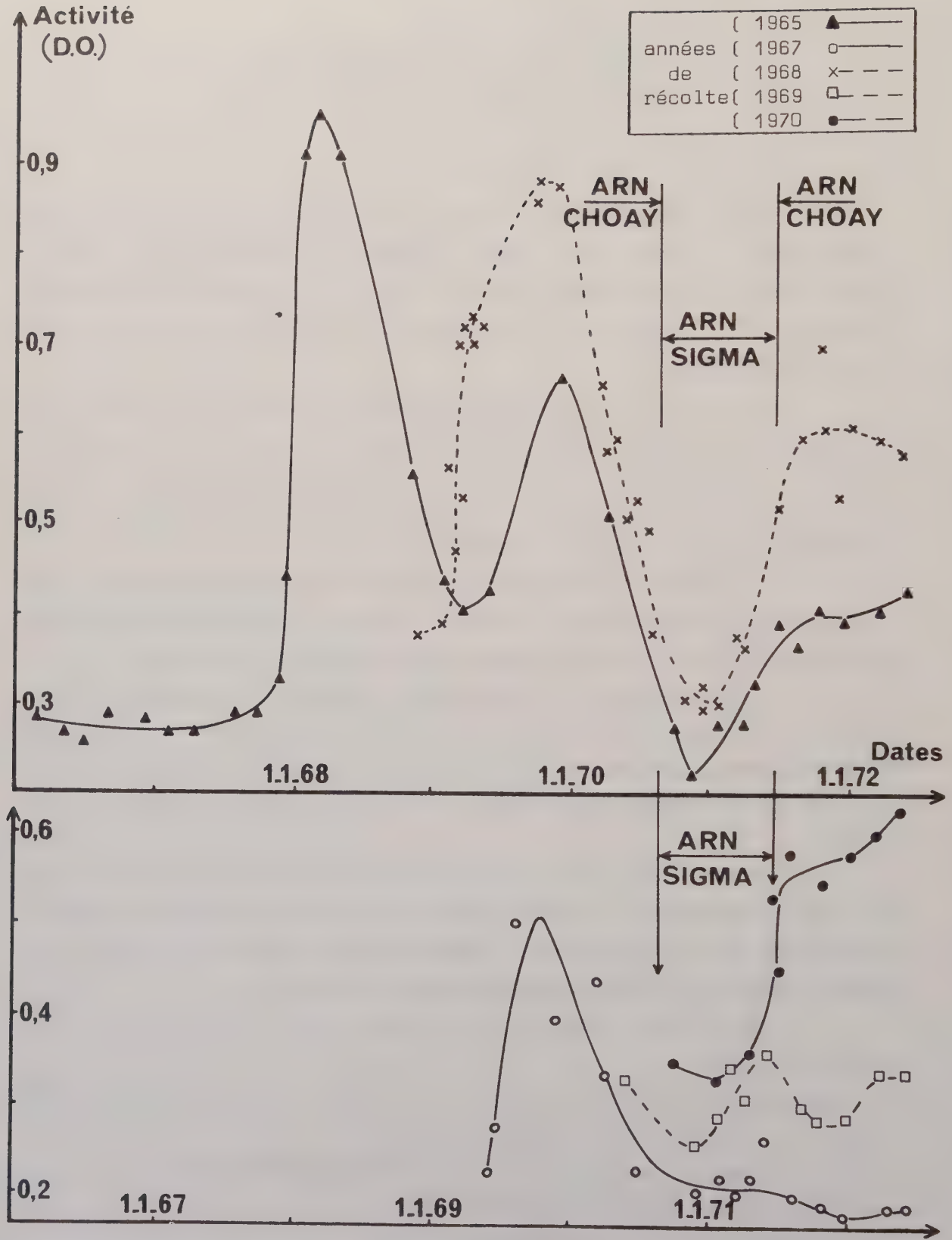


Fig. 17 : Evolution, en fonction du temps, de l'activité RNA-asique de blés à une teneur en eau de l'ordre de 16 % S.S., stockés à + 7°C.

1- ACTIVITE RNA-ASIQUE.

1-1- Evolution de l'activité RNA-asique des échantillons témoins.

1-1-1- Description des phénomènes observés.

La fig. 17 montre la variation, en fonction du temps, de l'activité RNA-asique des blés "témoins" conservés à + 7°C.

On observe que :

- les activités des différents lots de blé témoin fluctuent cycliquement en fonction de la durée de conservation ;
- les cycles observés ne correspondent pas à des périodes précises de l'année, les fortes activités ayant été décelées successivement en hiver 1968, en automne 1969 et en été 1971 ;
- l'amplitude des fluctuations d'activité est variable selon les échantillons ; en outre, pour un même échantillon, l'amplitude semble diminuer avec le temps. Il convient de souligner que MAUZE (1968) a observé que la valeur optimale de la valeur boulangère d'un lot de blé et la période à laquelle elle apparaît après récolte sont, toutes autres conditions égales, fonction des conditions de récolte, en particulier de l'état de "maturité" du grain au moment de celle-ci. Peut-être y a-t-il lieu de rapprocher de ces phénomènes les variations de cycle et d'amplitude des fluctuations d'activité RNA-asique observées.

Par ailleurs, des échantillons du même blé de variété Cappelle, récolté en 1965, utilisé dans nos essais, ont été entreposés à même teneur en eau lors d'une expérience de longue durée (C.N.E.E.M.A., 1968), soit à température ambiante, en cellule ventilée, sous CO_2 ou sous N_2, soit à -20°C, de mai 1966 à juillet 1968 (26 mois).

L'activité RNA-asique de tous les échantillons a évolué simultanément quelle que soit la température. De plus, l'accroissement de l'activité RNA-asique s'est produit dans chaque cas à la même époque que pour le blé stocké à + 7°C depuis la récolte. Cependant, cette activité pour les échantillons mis en expérience au C.N.E.E.M.A. et entreposés auparavant à température ambiante, correspondait entre mai 1966 et juin 1967 à une D.O. de 0,5 contre 0,28 pour le blé stocké à + 7°C depuis la récolte et, après l'augmentation d'activité observée en janvier 1968, à une D.O. de 1,2 contre 0,95 pour ce dernier lot.

1-1-2- Essais d'interprétation.

Il faut observer qu'à la teneur en eau où ces différents stockages ont été réalisés, environ 16 % S.S., l'absence d'eau solvante ne paraît pas permettre un métabolisme des enzymes, donc des fluctuations d'activité RNA-asique.

Dans l'état actuel de cette expérience toujours en cours, il semble très difficile de proposer une hypothèse explicative de ces phénomènes ; toutefois, il convient de faire les remarques suivantes :

1) L'hypothèse d'un artefact expérimental semble devoir être rejetée. En effet :

- des erreurs successives de dosage ne peuvent être mises en cause, car la reproductibilité de la mesure d'activité (coefficient de variation de 4,5 %) est bien inférieure à l'ordre de grandeur des fluctuations ;
- les variations observées ne peuvent être le fait d'une modification progressive de la dimension des particules du blé broyé avant extraction (cf. page 56), l'usure des meules du broyeur tend en effet à produire un accroissement de la dimension des particules entraînant une diminution de l'activité mesurée et non des fluctuations cycliques ; de plus, l'ordre de grandeur des erreurs qui en résultent est bien inférieur à celui des fluctuations observées ;
- une modification du substrat ARN ne peut non plus être invoquée ; en effet, il n'y aurait aucune raison pour que les variations soient cycliques, et le substrat le plus souvent utilisé (CHOAY) est particulièrement stable ;
- une variation du taux d'extraction des protéines n'est guère envisageable, quelques sondages ayant montré qu'il demeure constant.

2) Dans l'état actuel des choses, si la cause physiologique de ces fluctuations de l'activité RNA-asique extractible demeure obscure, on est cependant tenté de rapprocher ces variations des nombreuses observations publiées et faisant état d'augmentation d'activité, consécutives à un traumatisme subi par la plante (cf. annexe) ; en particulier, il serait du plus grand intérêt de vérifier si les fluctuations observées sont liées ou non à des changements d'activité d'effecteurs éventuels.

C'est pour tenter de mieux analyser ces phénomènes que nous avons mis au point un mode opératoire en vue d'isoler et de purifier la ou les enzymes en cause.

1-1-3- Fractionnement.

Le technique mise au point pour l'isolement et la préparation de l'extrait enzymatique cryodesséché pouvant se conserver sans perte d'activité permet de disposer à volonté d'extraits issus de blés. Il devient donc possible de comparer entre elles les activités mesurées sur ces extraits de blé effectués à différentes périodes du cycle, et de procéder à leur fractionnement et à leur analyse. Les recherches se poursuivent actuellement dans ce sens, et nous avons effectué deux filtrations sur gel (cf. page 67) dont les résultats sont reportés sur les fig. 18 et 19.

L'examen de la fig. 18 permet les observations suivantes :

- il semble que les peptides et protéines de PM sensiblement inférieur à 30.000 et présentant une absorption à 280 nm, aient été très largement éliminés lors des purifications précédentes, car la majeure partie des protéines apparaît dans le volume d'exclusion ;
- l'activité RNA-asique se trouve pratiquement localisée dans le volume mort ou dans les fractions très voisines, ce qui laisse supposer que le PM de la fraction active de l'enzyme ou d'un complexe enzymatique est proche de 30.000 ;
- si l'on est en présence de plusieurs enzymes, le pH optimum d'activité de la majorité d'entre elles est inférieur à la neutralité ;
- aucune activité nucléasique n'a été mise en évidence dans les fractions de PM inférieures à 30.000.

L'essai sur Sephadex G 100 représenté sur la fig. 19 confirme et précise certains points. On observe que l'activité nucléasique se manifeste essentiellement par l'existence d'un pic important. Cependant, il est possible qu'un second pic beaucoup plus faible puisse exister ; il représenterait l'activité d'une ou plusieurs enzymes dont le PM serait plus important que celui de la première enzyme mise en évidence et dont le pH optimum d'activité serait plus proche de 7 que de 5. Ces observations concordent étroitement avec les travaux antérieurs. Il y a lieu cependant d'être prudent, car l'activité ainsi mesurée est à la limite de notre méthode de dosage.

1-1-4- Prospective.

Les observations effectuées nous permettent d'envisager les étapes ultérieures.

Il s'agirait, en premier lieu, de vérifier si les diagrammes d'élution obtenus lors des filtrations sur gel évoluent au cours des variations cycliques observées.

Les filtrations sur gel devraient pouvoir nous permettre, en second lieu, de caractériser les fractions présentant une activité enzymatique dans certaines parties du caryopse du grain. C'est dans cette optique que deux sondages préliminaires de localisation ont été effectués. Le premier a permis de mettre en évidence dans la partie du grain de blé contenant le germe une activité RNA-asique plus importante que dans le grain entier. Le second a consisté à doser l'activité RNA-asique d'issues de mouture industrielle d'un blé sain présentant une capacité germinative supérieure à 95 %. Il nous est apparu que, parmi les fractions suivantes : gros son, fin son, remoulage bis, germe et farine, c'est dans le remoulage bis que l'on observe la plus forte activité. Cette activité est 1,4 fois plus importante que celle dosée dans le grain entier.

Le dosage effectué à partir des issues,délipidées ou non, ne fait pas apparaître de différence significative. Compte tenu du premier essai, on pourrait penser, en toute première approximation, que c'est au niveau du scutellum et non du germe proprement dit que se situe la fraction présentant la plus importante activité.

Ces observations ne pourront être précisées qu'avec l'emploi d'autres moyens. On envisage de procéder à une filtration sur résine échangeuse d'ions de type SE C-50 Sephadex qui devrait pouvoir permettre de dissocier, pour un pH supérieur à 5, des protéines de PM supérieur à 20.000 et ayant des charges différentes. En outre, le comportement électrophorétique des fractions ainsi obtenues doit également fournir des renseignements intéressants.

Ainsi, par l'emploi successif de procédés de plus en plus élaborés, nous espérons pouvoir obtenir pures la ou les enzymes présentes dans l'extrait initial, et les comparer à celles mises en évidence par d'autres auteurs dans d'autres céréales.

La connaissance de leurs effecteurs peut également fournir des éléments précieux pour expliquer les phénomènes complexes observés ; ce sera là un travail de longue haleine.

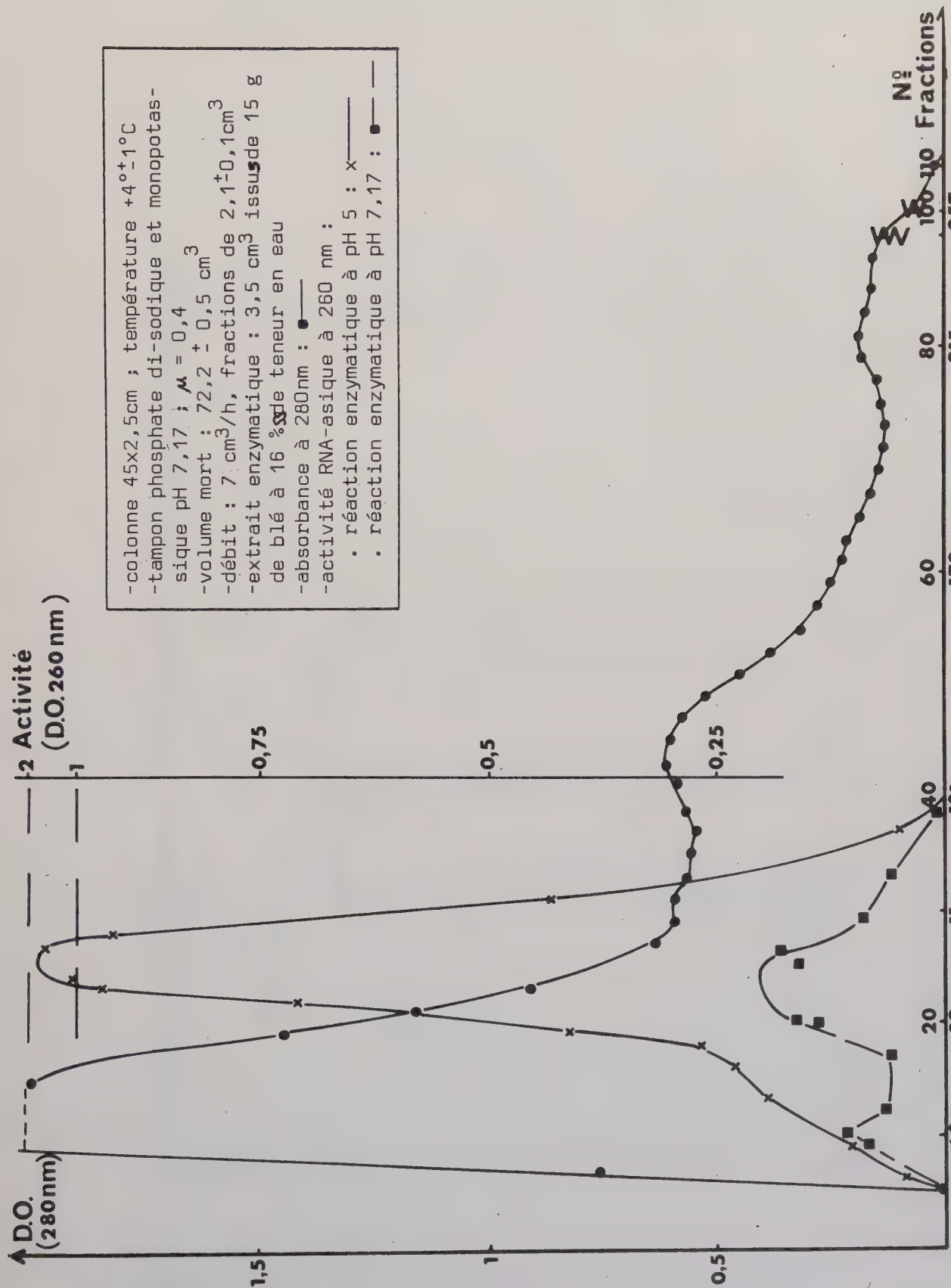


Fig. 18 - Gel-filtration sur Sephadex G 50 medium d'un extrait de blé.

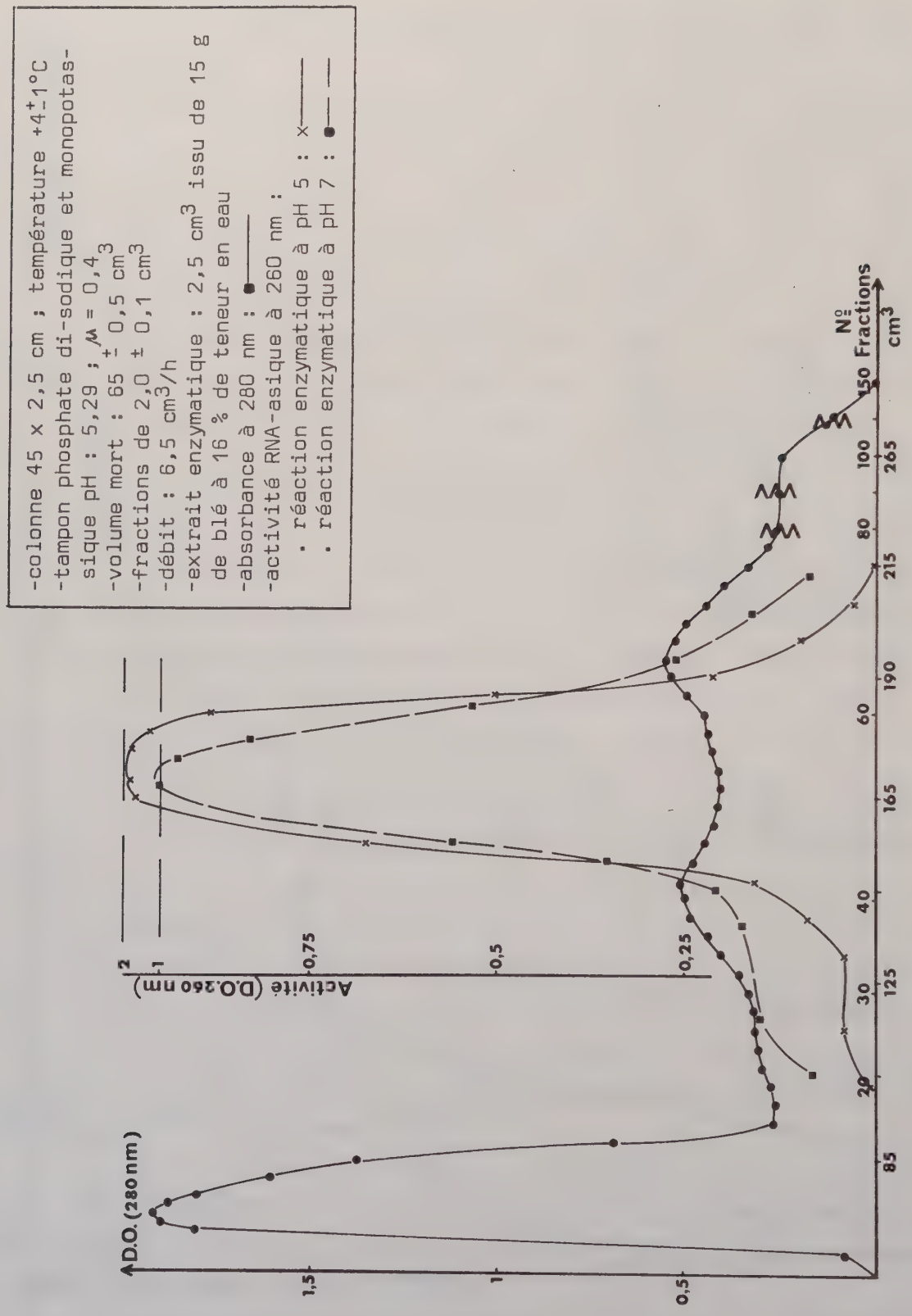


Fig. 19 : Gel-filtration sur Sephadex G 100 d'un extrait de blé.

1-2- Evolution de l'activité RNA-asique des échantillons stockés à différentes humidités relatives à 25 et 30°C.

De nombreuses déterminations de l'activité RNA-asique ont été effectuées pendant les conditionnements 68-30, 68-25 et 67-25. L'examen des fig. 20 et 21, où les résultats, obtenus en fonction de la durée de stockage, sont exprimés par le rapport de l'activité RNA-asique au temps t à l'activité du lot témoin, conduit à faire trois remarques :

- dans le cas du conditionnement 68-30 (fig. 20), l'activité a apparemment beaucoup fluctué au cours des 46 premiers jours du stockage, puis le rapport A/A_t est resté sensiblement constant jusqu'au 110e jour ; au cours du conditionnement 68-25 (fig. 21), le rapport A/A_t est resté constant jusqu'à la fin du stockage (132 jours) ;
- dans le cas du conditionnement 67-25 (fig. 21), on observe, à la plus forte humidité relative, un important accroissement de l'activité RNA-asique, comparativement à celle présentée par le témoin ; aux autres H.R., le rapport reste constant ;
- enfin, dans le cas du conditionnement 68-30 (fig. 20), une diminution du rapport A/A_t semble se produire après 220-250 jours de stockage.

Nous allons essayer d'expliquer successivement ces trois observations.

1-2-1- Invariance du rapport A/A_t du blé Cappelle 1968, au début du stockage.

Si, dans le cas du stockage 68-30 (46 premiers jours), on teste la liaison entre durée de stockage et rapport des activités RNA-asiques, on met en évidence un coefficient de corrélation r = 0,182. La corrélation n'est donc pas significative (r 5 % = 0,273 pour 49 d.d.l.).

Les fluctuations apparentes sont dues, comme cela a été souligné (cf. page 63),au manque d'entraînement de l'opérateur.

De même, dans le cas du conditionnement 68-25 (fig. 21), le coefficient de corrélation entre durée de stockage et rapport d'activités RNA-asiques (A/A_t) n'est pas significatif (r = 0,3 pour r 5 % = 0,5 et 14 d.d.l.).

Les déterminations d'activité effectuées lors de l'essai de conservation 68-25-97, 68-25-87 et 68-25-80 confirment, après 80 jours de stockage, l'invariance de l'activité RNA-asique rapportée à la valeur du témoin.

1-2-2- Accroissement du rapport A/A_t pour le blé Cappelle 1967 stocké à H.R. de 95 % à + 25°C.

Lors du stockage 67-25-95 (fig. 21), un net accroissement du rapport A/A_t a été mis en évidence. Il ne peut s'agir d'un artefact, car l'expérience ayant été recommencée ultérieurement, on a mis en évidence, après 7 jours de stockage, un accroissement d'activité de 355 % par rapport à celle du témoin.

Ce résultat est à rapprocher de l'observation faite par MULTON (publication C.N.E.E.M.A. 1968), selon laquelle, après 30 jours d'un stockage à + 25°C à 90 % d'H.R., le Cappelle récolté en 1965 présentait un accroissement du rapport d'activité A/A_t de 170 %.

Tout se passe comme s'il y avait un rapide accroissement d'activité RNA-asique lors d'un stockage à H.R. élevée, à 25°C, et un accroissement beaucoup plus tardif (9 à 10 mois plus tard) pour le même blé conservé à plus faible H.R. Il semble donc qu'à 25°C, une humidification, suffisamment importante du grain favorise l'accroissement de son activité RNA-asique.

1-2-3- Décroissance du rapport A/A_t lors d'un stockage prolongé du blé Cappelle 1968 à + 30°C.

Lors du conditionnement 68-30, les déterminations d'activité, effectuées entre le 220 et le 248e jours de stockage, font apparaître une baisse du rapport des activités RNA-asiques, quelle que soit l'hydratation du blé.

Le stockage 68-30 ayant débuté le 6 février 1969, il apparaît que la décroissance de A/A_t, observée vers le début de septembre de la même année, correspond (fig. 17) à un stade de très sensible accroissement d'activité du blé témoin conservé à + 7°C.

Dans ce cas, on assiste soit à un blocage, soit à une perte d'activité du blé stocké expérimentalement due, semble-t-il, à la température de stockage (+ 30°C), puisque cette perte se produit aussi bien sur le blé relativement peu humide que sur blé conservé à 88-92 % H.R.

Cependant, ces résultats sont à considérer avec la plus grande réserve car, rappelons-le, au cours du conditionnement effectué sur le blé Cappelle récolté en 1968 et dont les résultats sont représentés sur la fig. 21, aucune variation ne s'est produite après le 150e jour de stockage.

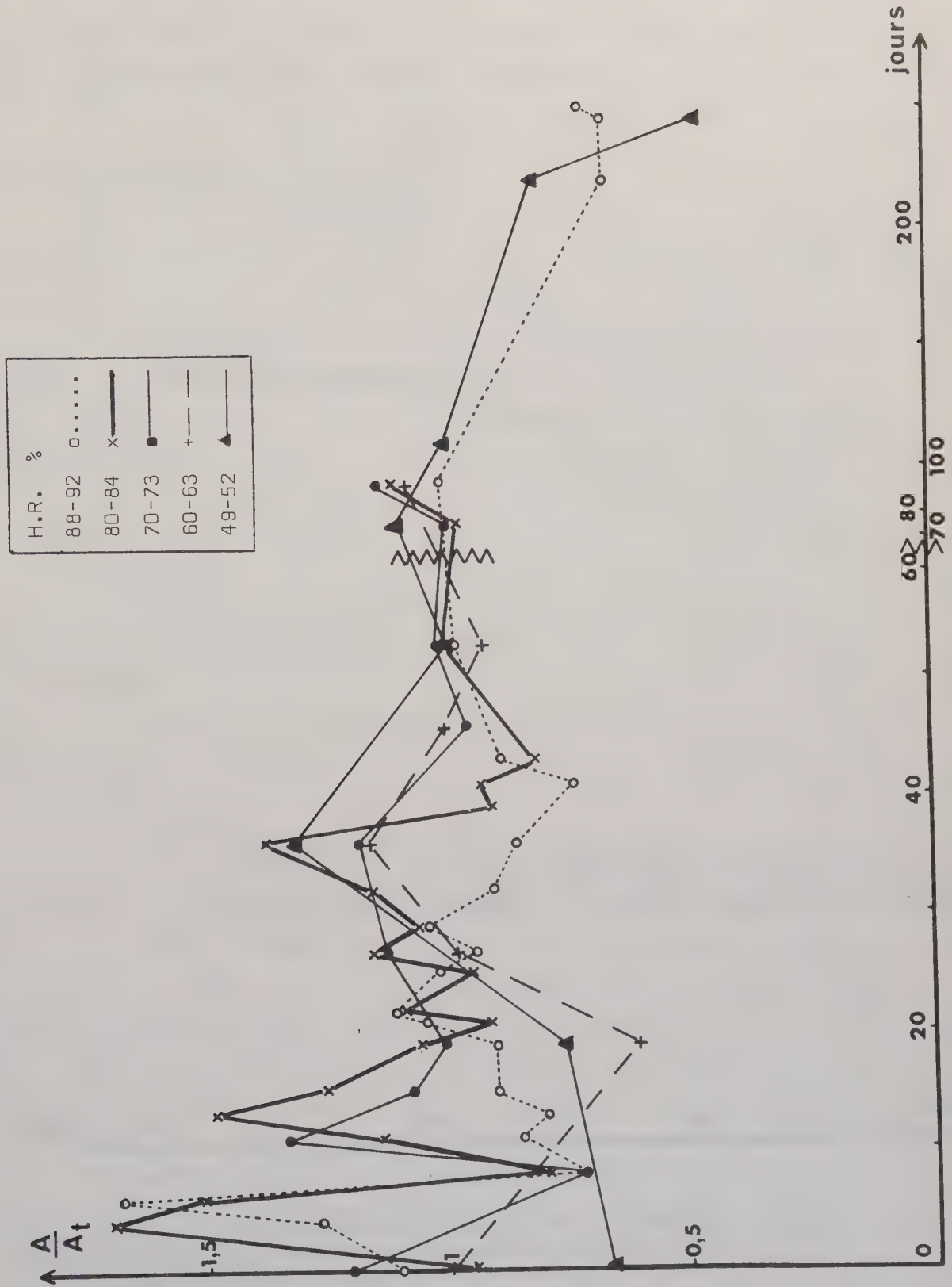


Fig. 20 : Variations,par rapport à celles du témoin, de l'activité RNA-asique du Cappelle récolté en 1968 et conditionné à différentes humidités relatives à +30°C, selon la durée de stockage.

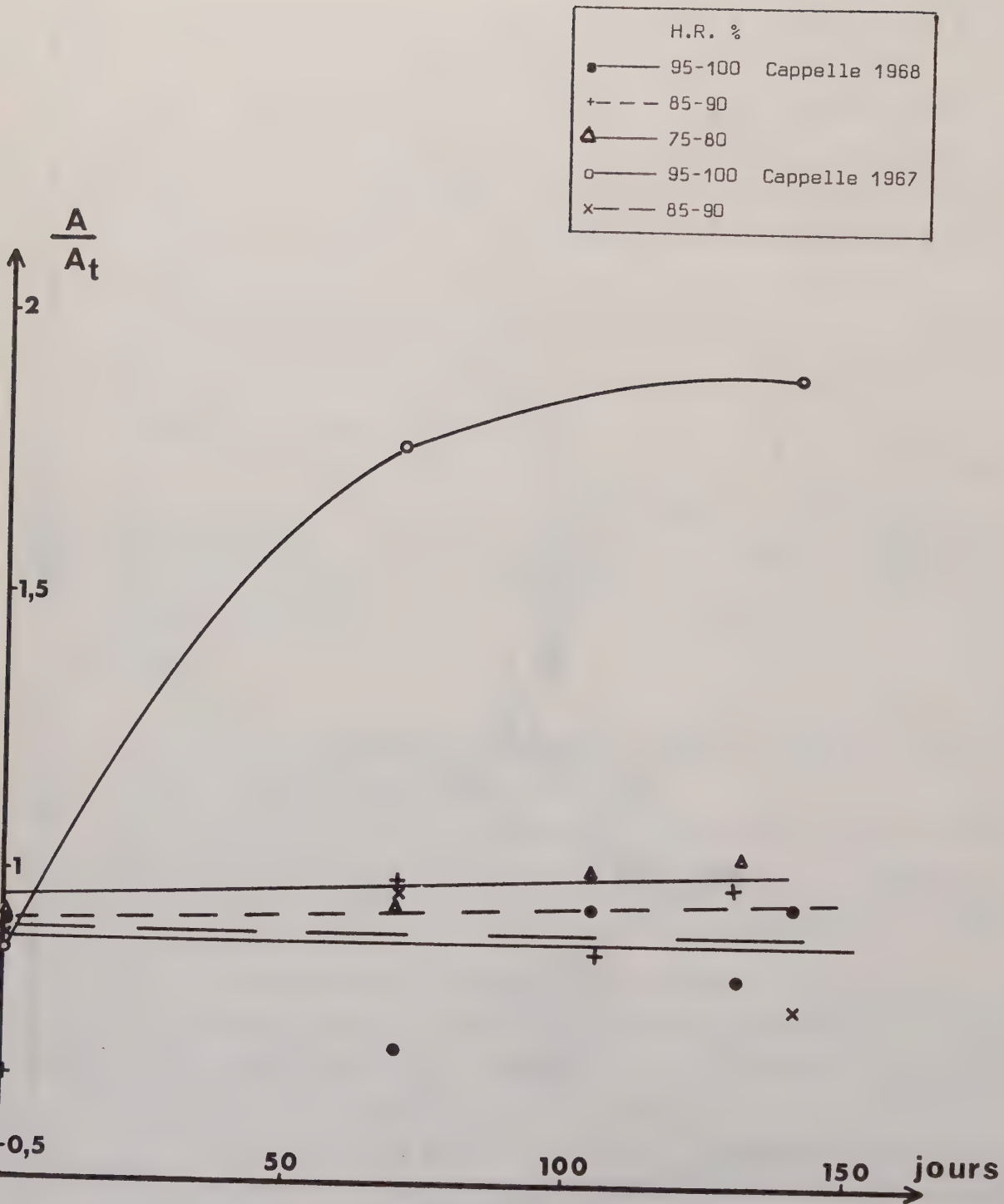


Fig. 21 : Variations, par rapport à celles des témoins, de l'activité RNA-asique des Cappelle récoltés en 1967 et 1968, conditionnés à différentes humidités relatives à +25°C, selon la durée de stockage.

De plus, les déterminations d'activité effectuées lors des essais 68-25-95, 68-25-85 et 68-25-80, font respectivement apparaître, au terme des 343 jours de stockage, des rapports A/A_t de 1,26 - 0,7 et 0,86.

1-3- Discussion des résultats obtenus.

L'analyse de ces différentes expériences permet de formuler les conclusions préliminaires suivantes : dans la mesure où une température de stockage (30°C) ne risque pas de provoquer une inhibition thermique, l'activité RNA-asique d'un blé dont l'hydratation est élevée s'accroît après un temps sensiblement plus court que celle d'un blé dont l'hydratation est plus faible. Pour les blés relativement peu humides, qu'ils soient conservés sous N_2, CO_2 ou en atmosphère renouvelée, stockés de - 20°C à + 30°C, en grains ou broyés, l'activité RNA-asique, si elle fluctue, varie de façon non significative dans nos conditions expérimentales (150 jours ; 16 % S.S.).

Par ailleurs, l'activité RNA-asique est très certainement fonction de l'année et des conditions de récolte, c'est-à-dire des conditions écologiques.

Le rôle des micro-organismes, dans le cas des grains humides, est difficile à établir. On a pu observer, sur des blés moisis, une activité RNA-asique identique à celle du témoin. Cependant, lorsque l'activité RNA-asique s'accroît au cours d'un stockage à H.R. élevée, il n'est pas interdit de penser qu'une partie de l'activité ribonucléasique supplémentaire soit induite par la population fongique.

En résumé, il semble que lorsqu'il n'y a pas inactivation thermique (comme, par exemple, dans le cas de l'expérience de stockage 68-30), l'activité RNA-asique augmente lorsqu'il y a vieillissement de l'organisme végétal ; ceci concorde bien avec le fait plusieurs fois signalé dans la littérature (cf. annexe), que, lors de traumatismes de toute nature imposés à la plante, il y a toujours augmentation de l'activité RNA-asique.

Il reste à préciser si ce phénomène est dû à l'existence de plusieurs RNA-ases aux comportements différents, au démasquage ou à l'accroissement d'une des enzymes existantes, ou à l'action d'effecteurs.

Selon les travaux antérieurs, il apparaît que deux RNA-ases existent et que, lors de traumatismes, l'une est synthétisée de nouveau. Cependant, récemment, certains auteurs remettent en question ce dernier point et envisagent le rôle possible d'effecteurs.

Les sondages préliminaires que nous avons effectués ne nous permettent pas actuellement de trancher.

Quoi qu'il en soit, il y a là un champ d'investigation très intéressant que nous espérons avoir la possibilité d'aborder ultérieurement.

2- CAPACITE GERMINATIVE : C.g. ET TEMPS MOYEN DE GERMINATION : Tm.

Rappelons que, pour éliminer les fluctuations de Tm dues aux conditions de préparation, cette valeur est généralement exprimée par rapport au Tm_t qui est le temps moyen de germination du blé témoin déterminé à la même époque que le Tm, soit Tm/Tm_t.

Les évolutions simultanées, en fonction de la durée de stockage, de la C.g. et du rapport Tm/Tm_t sont présentées sur la fig. 22 dans le cas des stockages 67-25 et 68-25, sur la fig. 23 dans le cas des stockages 68-30-90 et 68-30-80, et sur la fig. 24 dans le cas des stockages 68-30-70, 68-30-60 et 68-30-50. Toutefois, ne sont pas représentées sur cette dernière figure les évolutions non significatives des C.g. relatives aux deux derniers stockages (C.g. $>$ 95 %).

2-1- Evolution de la C.g. au cours des stockages expérimentaux.

D'une façon générale, la C.g. demeure constante pendant un certain temps, puis diminue brusquement, le temps de latence est d'autant plus bref et la décroissance d'autant plus rapide que la température et surtout l'humidité sont plus élevées. Le tableau XII indique,dans la première partie, les durées de conservation correspondant à des C.g. égales respectivement à 70 et 0 %, et pour les diverses H.R. de stockage du blé. La C.g. égale à 70 % correspond à la limite inférieure empirique, au-dessus de laquelle un blé peut être, dans certaines conditions, considéré comme utilisable en panification (GUILBOT et POISSON, 1963).

Les résultats ainsi obtenus sont en bon accord avec ceux des travaux de GUILBOT et POISSON, CHRISTENSEN, TRISVYATSKII, BOTTOMLEY et al., GLASS et al., et LINKO. Une réserve est cependant à formuler dans ce dernier cas, le nomogramme de LINKO ayant été construit pour des humidités assez faibles, et par conséquent pour des durées de stockage plus longues que celles considérées ici ; de plus, il est relatif à la conservation en atmosphère confinée et non en atmosphère renouvelée.

Dans la seconde partie du tableau XII, figurent les durées de conservation correspondant à une C.g. résiduelle de 50 %. Ces valeurs nous ont permis de vérifier si la formule de ROBERTS (1960)(cf. page 25) pouvait être appliquée à nos résultats, en comparant la teneur en eau calculée avec la valeur expérimentale à laquelle devait se trouver le grain.

Il apparaît que les valeurs d'hydratation ainsi calculées ont tendance à être plus élevées que celles observées expérimentalement, notamment pour les essais 68-25-95 et 68-25-85. Comme les expériences de ROBERTS ont été réalisées en atmosphère confinée, nous avons tenté de préciser si ce fait pouvait rendre compte des écarts observés. Pour cela, ne disposant pas suffisamment d'essais à températures différentes, nous avons utilisé les résultats partiellement publiés par POISSON et GUILBOT (1963 a et b), à l'issue d'un essai de stockage en atmosphère renouvelée portant sur du blé de variété P'tit Quinquin.

Ces résultats sont représentés graphiquement sur la fig. 25 ainsi que ceux de l'un de nos essais (stockages 68-30-90, 80 et 70 ; cf. tabl. XII) ; nous avons reporté, en outre les isothermes déterminés par ROBERTS.

TABLEAU XII - Durées de conservation, en jours, déterminées d'après le critère de la capacité germinative, dans le cas de stockages à différentes H.R. et températures. Les dernières lignes de ce tableau indiquent les teneurs en eau (exprimées en % de la S.H. et de la S.S.), calculées selon la formule de ROBERTS (1960) à partir de nos valeurs expérimentales de durée de stockage aboutissant à la C.g. = 50 %.

Température de stockage °C		30			25		
H.R.		85-92	80-84	70-73	91-97	84-88	76-80
H_2O % réelle du blé	S.H.	19,5	17,0	14,0	25,0	19,0	15,5
	S.S.	24,0	20,0	17,0	33,0	23,0	18,0
Durées de stockage (jours) nécessaires pour atteindre une C.g. de :	70 %	16	36	135	5-10	10-15	plus de 130
	0 %	45	75	180	20	30-45	
	50 %	21	39	140	5-10	14-21	
H_2O % du blé calculée selon ROBERTS	S.H.	21	18	13	29-26	25-23	
	S.S.	26	22	15	40-35	33-30	

Les données mesurées à partir de ce graphique sont rassemblées dans le tableau XIII.

Le tableau XIV est relatif aux valeurs extrêmes de k_v, C_1 et C_2 calculées à partir des chiffres du tableau précédent, ainsi qu'aux valeurs de ces constantes fournies par ROBERTS dans le cas du blé.

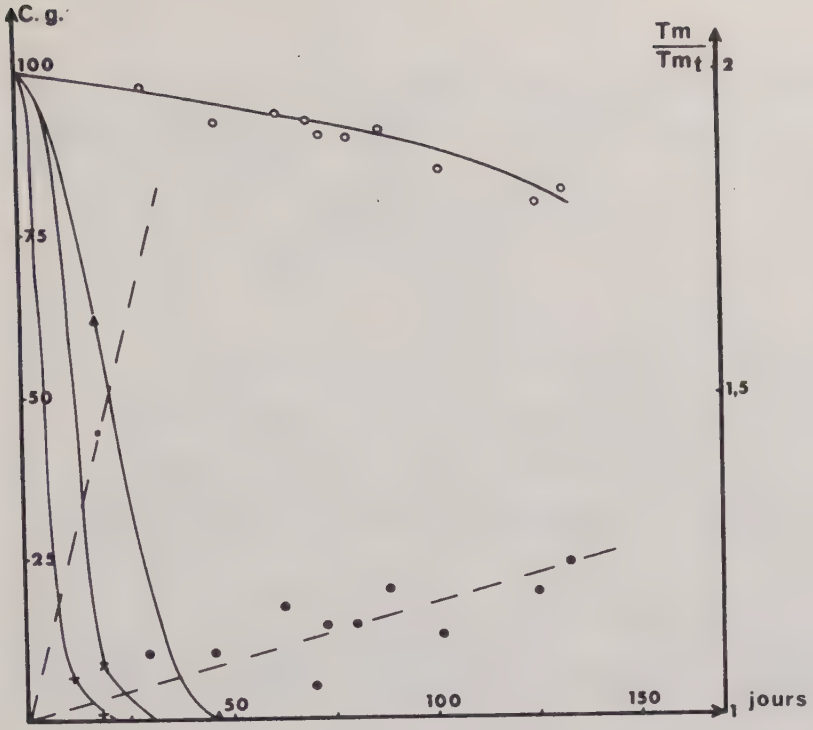
Il apparaît que, dans la limite des erreurs expérimentales, il existe une bonne concordance entre ces résultats, ce qui semble indiquer que, dans la limite de ces conditions expérimentales, l'influence de l'atmosphère, confinée ou renouvelée, reste faible.

TABLEAU XIII - Durées de conservation, en semaines (entre parenthèses, le logarithme de ces durées) correspondant à une capacité germinative résiduelle égale à 50 %, en fonction des teneurs en eau et températures de stockage du blé de variété P'tit Quinquin (interprétation graphique de la fig. 25).

H_2O % S.H. / °C	15	24
15	68 (1,8325)	6,2 (0,7924)
25	18,5 (1,2672)	2,25 (0,3522)
35	5,7 (0,7559)	0,92 ($\bar{1}$,9638)

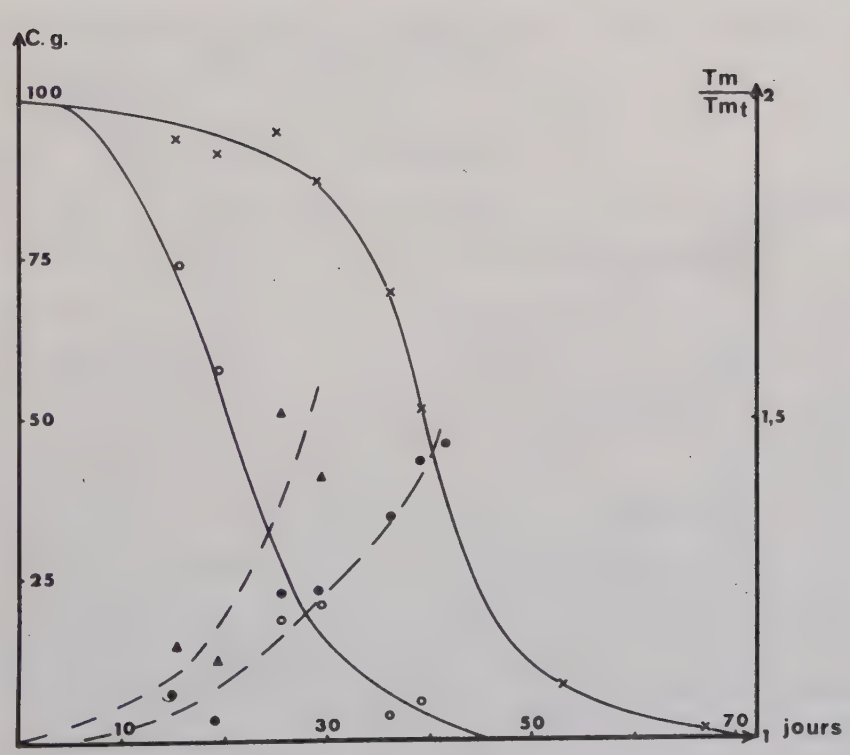
TABLEAU XIV - Valeurs des constantes k_v, C_1 et C_2 déterminées dans le cas du blé par ROBERTS, comparées à celles calculées à partir de données de POISSON et GUILBOT (1963).

SELON ROBERTS	Constantes		k_v	C_1	C_2
	Valeur de ces constantes		4,222	0,108	0,050
Valeur des constantes calculées à partir des résultats de POISSON et GUILBOT.		minimum	3,865	0,088	0,051
		maximum	4,413	0,115	0,056



stockages	C.g.	Tm/Tm_t
68-25-75	o——	●——
68-25-95)	+——	
67-25-95)		
68-25-85	x——	
67-25-85	Δ——	■——

Fig. 22 : Evolution, en fonction de la durée du stockage, de la capacité germinative C.g. et du temps moyen de germination par rapport à celui du témoin (Tm/Tm_t) de blés, variété Cappelle, récoltés en 1967 et 1968, conditionnés à + 25°C, à différentes H.R.



H.R. %	Tm	C.g.
88-92	Δ	o
80-84	●	x

Fig. 23 : Evolution, en fonction de la durée de stockage, de la capacité germinative C.g. et du temps moyen de germination par rapport à celui du témoin (Tm/Tm_t) de blé variété Cappelle récolté en 1968, conditionné à + 30°C à différentes H.R.

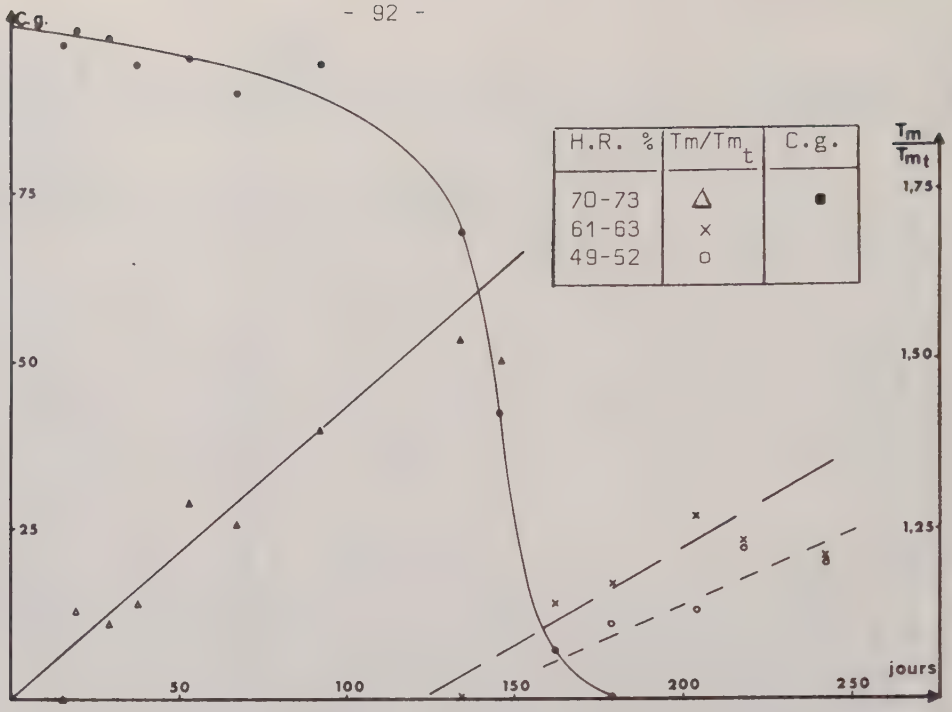


Fig. 24 : Evolution,en fonction de la durée du stockage, de la capacité germinative C.g. et du temps moyen de germination par rapport à celui du témoin (Tm/Tm_t) d'un blé variété Cappelle récolté en 1968, conditionné à +30°C à différentes H.R.

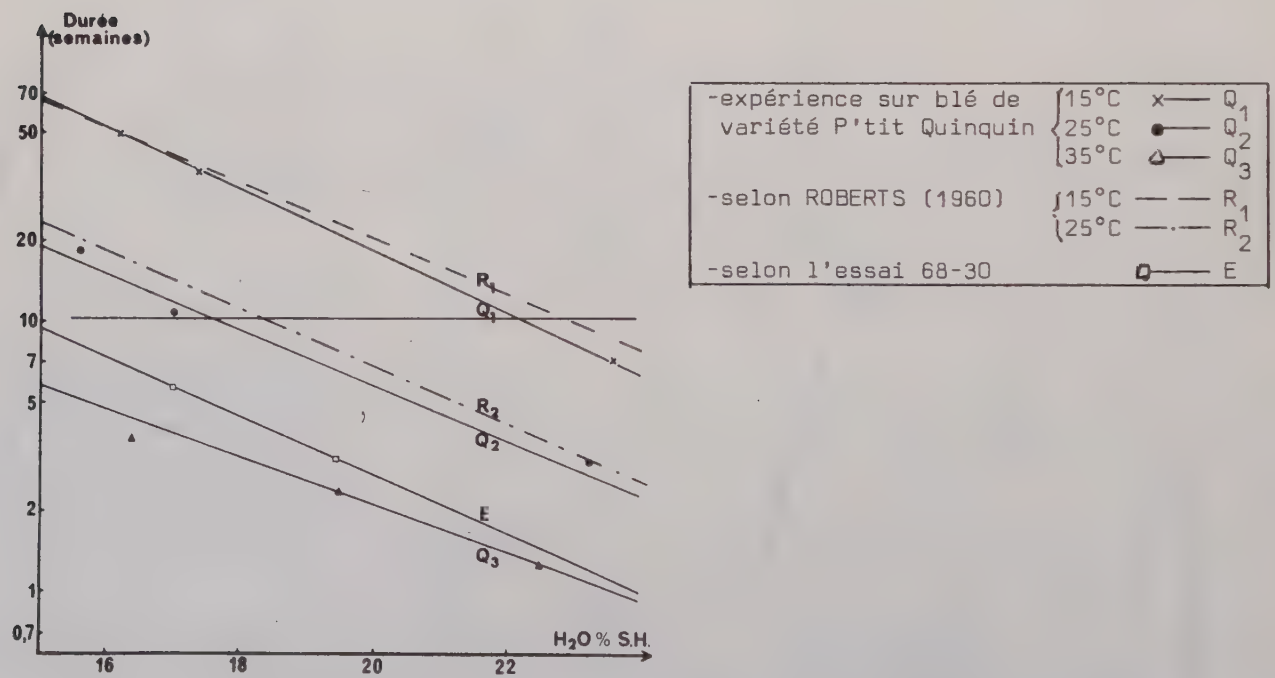


Fig. 25 : Isothermes de conservation de blé établis à partir de la formule de ROBERTS (1960) : $\log_p = k_v - C_1 m - C_2 t$ où :

- p : durée en semaines au bout de laquelle C.g. = 50 %
- t : température
- m : teneur en eau du grain en S.H.
- k_v, C_1, C_2 : constantes dont les valeurs sont respectivement, pour le blé, 4,222, 0,108 et 0,050.

2-2- Evolution du rapport Tm/Tm_t au cours des stockages expérimentaux.

Sur le tableau XV sont représentées les caractéristiques des liaisons entre la durée de stockage et les variations du rapport Tm/Tm_t, pour quatre stockages expérimentaux.

On observe que :

- d'une part, au cours des stockages 68-30-70, 68-30-60 et 68-30-50, si la C.g. ne montre pas de variation significative (C.g. $\geq$ 90 %), le Tm/Tm_t croît par contre de façon importante dès le début du premier stockage, et après 130 jours pour les deux autres ;
- d'autre part, au cours du stockage 68-25-75, la C.g. diminue de 100 à 80 %.

On met ainsi en évidence, au moins dans deux cas, un accroissement très significatif de Tm/Tm_t alors que la C.g. demeure constante ou varie assez peu. Pour apprécier le début de l'altération, la mesure du Tm fournit donc une réponse plus sensible et surtout plus rapide que celle de la C.g.

TABLEAU XV - Caractéristiques des corrélations entre la durée de stockage et le rapport Tm/Tm_t, pour quatre essais expérimentaux (la durée considérée est celle pendant laquelle la C.g. reste invariable ou varie peu, tandis que le rapport Tm/Tm_t s'accroît).

r : coefficient de corrélation

r 5 % : seuil de signification (au risque de 5 %) de r

S ou NS : significatif ou non significatif

Stockages étudiés	C.g. %	Durées de stockage considérées (en j)	Nombre de d.d.l.	r 5 %	r calculé et signification
68-30-70	$\geq$ 90	6-100	5	0,7545	0,945 S
68-30-60	$\neq$ 100	100-246	3	0,8783	0,939 S
68-30-50	$\neq$ 100	100-246	2	0,9500	0,790 NS
68-25-75	100 $\geq$ C.g $\geq$ 80	0-132	8	0,6319	0,632 S

2-3- Conclusion.

Au moins dans les limites des conditions expérimentales choisies pour cette étude, la méthode d'appréciation de la viabilité des céréales

par la mesure du Tm de germination constitue, en raison de sa grande sensibilité, une méthode de choix pour déceler les altérations dans le grain. Lors de stockages à température et surtout à hydratation élevées, la diminution de la C.g. suffit pour suivre l'altération du grain.

3- VARIATIONS DE L'ACIDITE "GRASSE" EXTRACTIBLE (A.G.) DU GRAIN.

3-1- Evolution de l'A.G. en fonction de la durée de stockage.

Les fig. 26 et 27 montrent l'évolution de l'A.G. exprimée en milliéquivalents pour 100 g de matière sèche, en fonction de la durée de stockage. On observe qu'aux humidités relatives suffisamment élevées (de l'ordre de 70 % à 30°C et de 80 % à 25°C), le taux d'A.G. s'accroît et atteint un palier dont l'ordonnée est fonction croissante de l'H.R.

Dans le cas du stockage à + 25°C (fig. 27), on observe que l'acidité s'accroît beaucoup plus, à même hydratation, pour le blé récolté en 1967 que pour celui récolté en 1968, ce qui laisse soupçonner l'importance des conditions de récolte. La fig. 28 montre l'évolution analogue de l'A.G. dans le cas du blé de variété P'tit Quinquin, conservé à différentes H.R. et à trois températures : 15, 25 et 35°C.

Dans le cas des stockages 68-30-70, 68-30-60 et 68-30-50, ainsi que dans ceux effectués par POISSON et GUILBOT (1963 b), aux températures et humidités relatives de, respectivement, 25°C - 78 % et 15°C - 80 %, l'A.G. ne varie guère.

Si nous testons la liaison entre la durée de stockage et les fluctuations d'A.G. à ces H.R. inférieures à 80 %, on n'observe pas de corrélation significative. Cela ne signifie pas obligatoirement qu'aux H.R. moyennes, l'A.G. n'évolue pas. Nous avons calculé (tabl. XVI) la moyenne des A.G. mesurées pendant toute la durée du stockage à ces H.R.

Statistiquement, les trois moyennes correspondant aux stockages 68-30-50, 60 et 70 ne sont pas significativement différentes pour le nombre réduit de mesures effectuées. Cependant, si l'on se réfère par exemple à la moyenne des A.G. du témoin Cappelle 1968 conservé à + 7°C ($m = 0{,}606 \pm 0{,}061$ pour 11 déterminations), on remarque que la moyenne des A.G. tend à augmenter quand l'H.R. de stockage s'accroît. En fait, pour les moyennes H.R., il existe, comme on peut l'observer sur la fig. 26, un temps de latence, avant l'accroissement d'A.G., d'autant plus important que l'H.R. de stockage est plus basse.

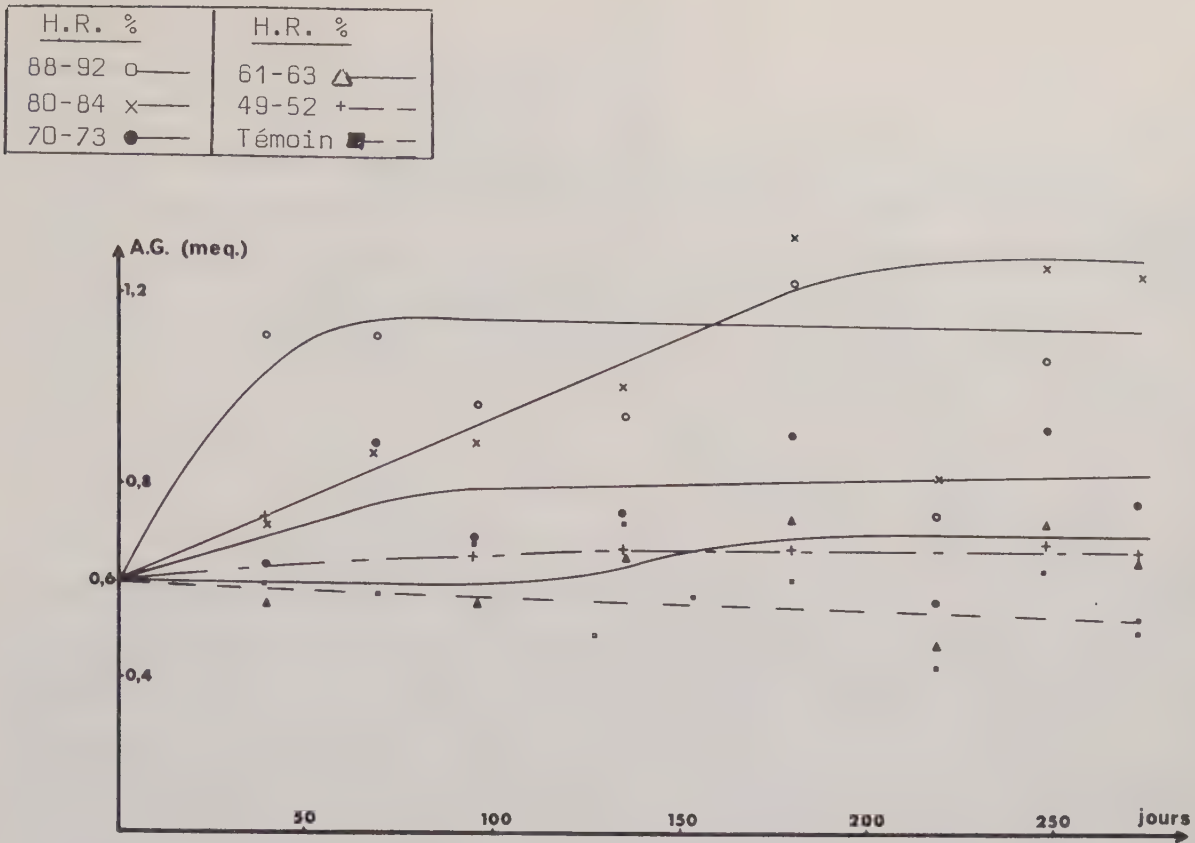


Fig. 26 : Evolution de l'acidité "grasse", en fonction de la durée de stockage, de blés variété Cappelle récoltés en 1968 et conditionnés à +30°C à différentes H.R.

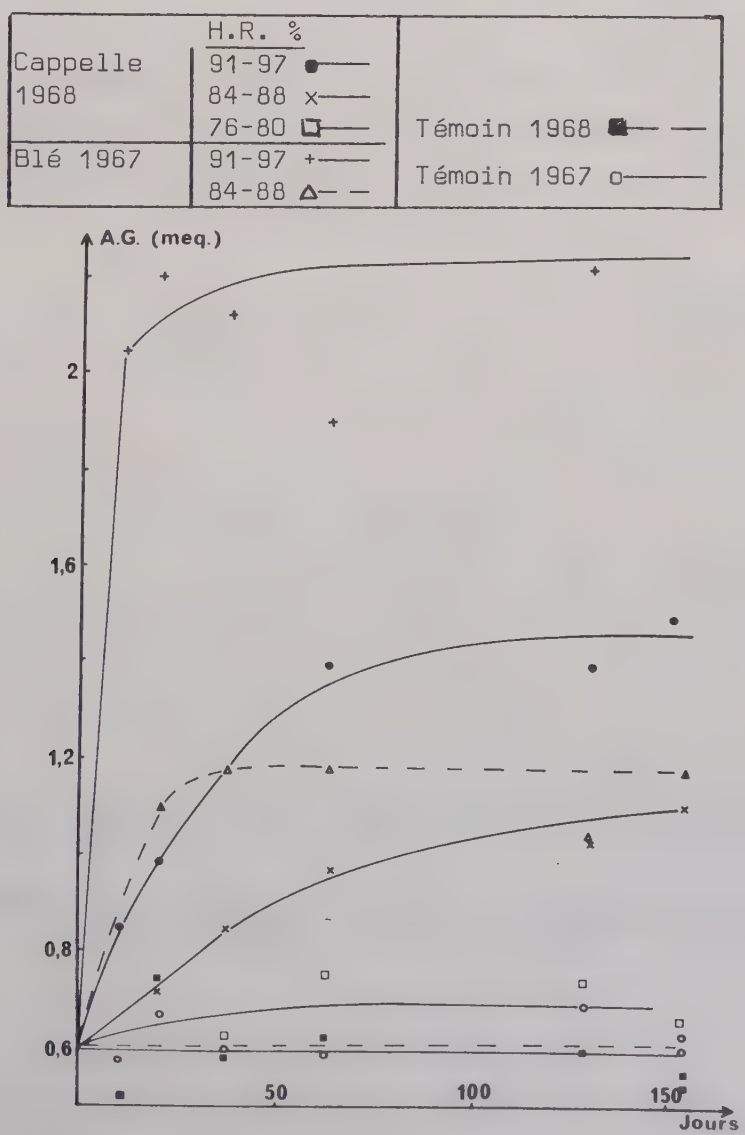


Fig. 27 : Evolution de l'acidité "grasse", en fonction de la durée de stockage, de blés conditionnés à +25°C à différentes H.R.

°C	H.R. %	H2O % S.S.
35	88	29,0 +
35	80	19,5 ▲
25	89	30,3 x
25	78	18,5 □
15	80	19,3 ●

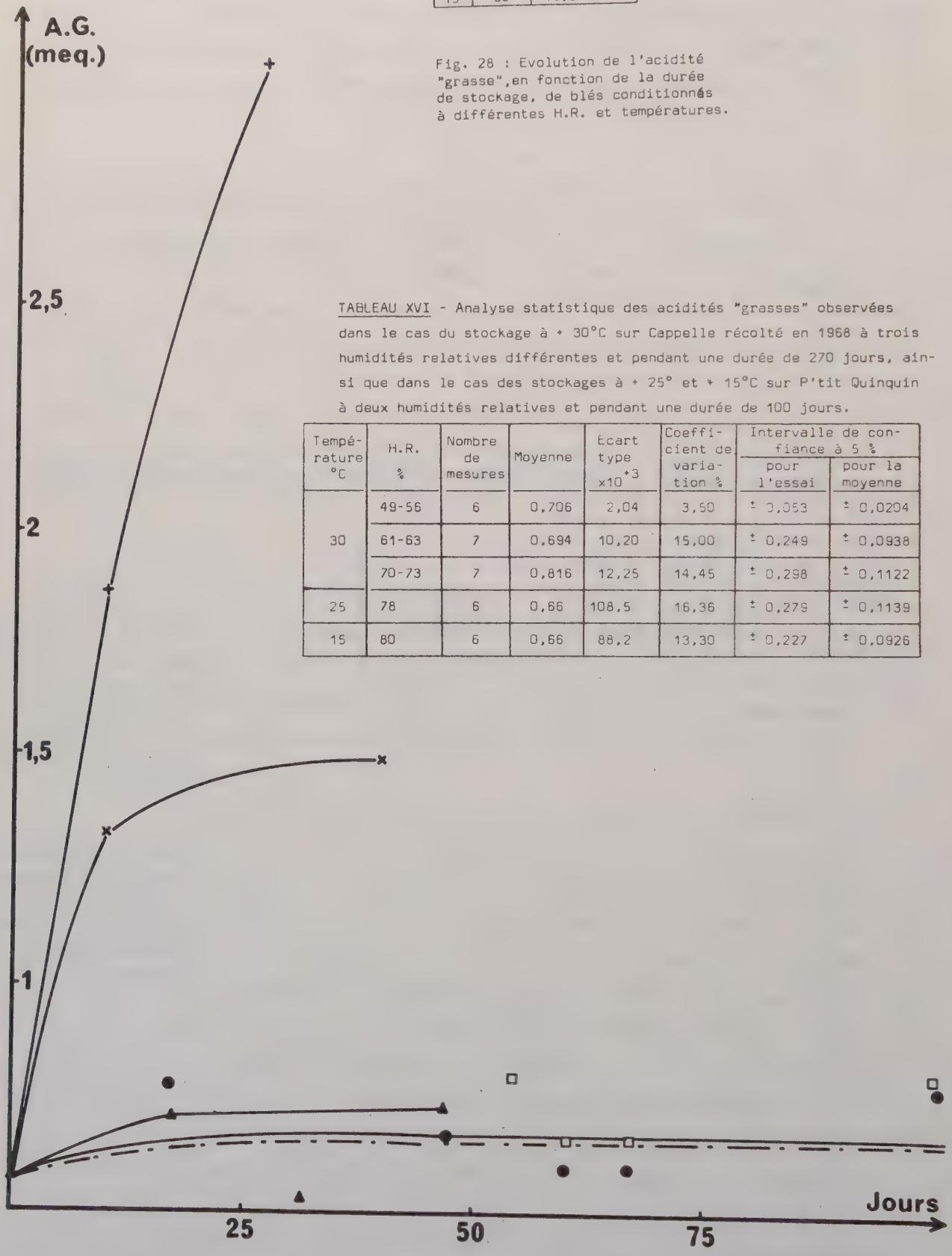


Fig. 28 : Evolution de l'acidité "grasse", en fonction de la durée de stockage, de blés conditionnés à différentes H.R. et températures.

TABLEAU XVI - Analyse statistique des acidités "grasses" observées dans le cas du stockage à + 30°C sur Cappelle récolté en 1968 à trois humidités relatives différentes et pendant une durée de 270 jours, ainsi que dans le cas des stockages à + 25° et + 15°C sur P'tit Quinquin à deux humidités relatives et pendant une durée de 100 jours.

Température °C	H.R. %	Nombre de mesures	Moyenne	Ecart type $x10^{+3}$	Coefficient de variation %	Intervalle de confiance à 5 %	
						pour l'essai	pour la moyenne
30	49-56	6	0,706	2,04	3,50	± 0,053	± 0,0204
	61-63	7	0,694	10,20	15,00	± 0,249	± 0,0938
	70-73	7	0,816	12,25	14,45	± 0,298	± 0,1122
25	78	6	0,66	108,5	16,36	± 0,279	± 0,1139
15	80	6	0,66	88,2	13,30	± 0,227	± 0,0926

De même, dans le cas du stockage 68-25-75, nous avons testé la liaison entre la durée de stockage et la variation d'A.G. Le coefficient de corrélation (r = 0,16) n'est pas significatif, au risque de 5 %. Dans ce cas précis, nous avons calculé la moyenne des A.G. correspondant aux différentes durées de stockage : m = 0,714 ± 0,10 (coefficient de variation 9,5 %). Compte tenu de la valeur moyenne du témoin (0,606 ± 0,61) nous pouvons considérer que l'acidité s'est accrue.

L'accroissement de l'A.G., aux hautes humidités relatives, semble être une fonction linéaire de la durée de stockage. Cependant, seul le stockage 68-30-80 nous permet de déterminer une liaison possible entre l'A.G. et la durée de stockage, car le nombre de données est suffisamment important. Le coefficient de corrélation observé (r = 0,73 ; r 5 % = 0,71) montre une liaison significative.

De ces différentes expériences, nous pouvons conclure qu'après une première phase de latence (dont la durée est plus ou moins importante selon l'hydratation du grain), l'acidité grasse s'accroît. Cette augmentation d'acidité, très faible aux moyennes H.R., devient d'autant plus importante que la teneur en eau est plus élevée, jusqu'à atteindre, après un temps de stockage variable, une certaine valeur limite. Les deux paramètres : temps de latence et valeur limite sont fonction, pour un blé considéré, de l'hydratation du grain et de la température de stockage.

3-2- Evolution de l'A.G. en fonction de la température et de l'H.R. de stockage.

Nous avons testé (tabl. XVII) la liaison pouvant exister, dans le cas du stockage à + 30°C, entre l'évolution de l'A.G. et les H.R. pour des durées égales de conservation.

Nous avons effectué la même analyse (tabl. XVIII) dans le cas du stockage à + 25°C, uniquement pour le Cappelle récolté en 1968, car nous ne disposons que de deux H.R. de stockage pour le blé récolté en 1967, ce qui est insuffisant.

Les points expérimentaux portés sur la fig. 29 correspondent aux cas où une corrélation significative a été décelée. On observe que les droites correspondant à une même température de stockage, mais à des durées différentes, se coupent sur l'axe des abscisses.

TABLEAU XVII - Analyse de la liaison entre l'évolution de l'acidité "grasse" et les humidités relatives, pour différentes durées de stockage, dans le cas d'un essai de conservation de blé variété Cappelle 1968 à 30°C.

r : coefficient de corrélation

r 5 % : seuil de signification (au risque 5 %) de r

NS ou S : non significatif ou significatif

a : pente de la droite de régression

b : ordonnée à l'origine de la droite de régression

b/a : abscisse à l'origine de la droite de régression

Durée de stockage (en j)	r	r 5 %	$ax10^{+3}$	b	$\frac{b}{a} \times 10^{+3}$
39	0,64	0,878 NS	9,18	0,117	12,8
68	0,87	0,950 NS	9,18	0,250	27,7
95	0,84	0,878 NS	10	0,067	6,6
138	0,88	0,878 S	10	0,112	11,1
179	0,93	0,878 S	19	- 0,351	- 18,5
246	0,87	0,878 NS	14,49	0,694	- 4,8
270	0,69	0,878 NS	11,22	0,694	6,2

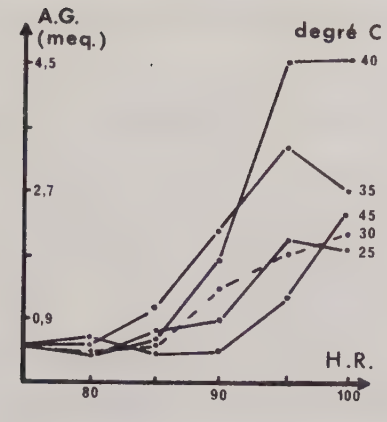
TABLEAU XVIII - Analyse de la liaison entre l'évolution de l'acidité "grasse" et l'humidité relative, dans le cas d'un essai de conservation à + 25°C de blé Cappelle récolté en 1968.

N.B. La signification des lettres employées est la même que dans le tableau XVII.

Durée de stockage (en j)	r	r 5 % d.d.l. = 1	$ax10^{+3}$	b	$\frac{b}{a} \times 10^{+3}$
37	0,9987	0,9969 S	23,1	1,18	51,32
63	0,9579	" NS	34,5	1,98	57,40
130	0,9999	" S	36,3	2,10	57,73
154	0,9987	" S	46,1	2,96	64,14
130-150	0,9988	" S	40,8	2,57	61,62

Selon BOTTOMLEY et al. (1950).
Expérience effectuée sur maïs
après 12 jours de stockage.

Cappelle 1968	25°C	o après 37 j de stockage (1)
		+ " 130-150 " (2)
	30°C	• " 138 " (3)
		x " 179 " (4)
P'tit Quinquin : 25°C Δ après 140 j Stock.(5)		



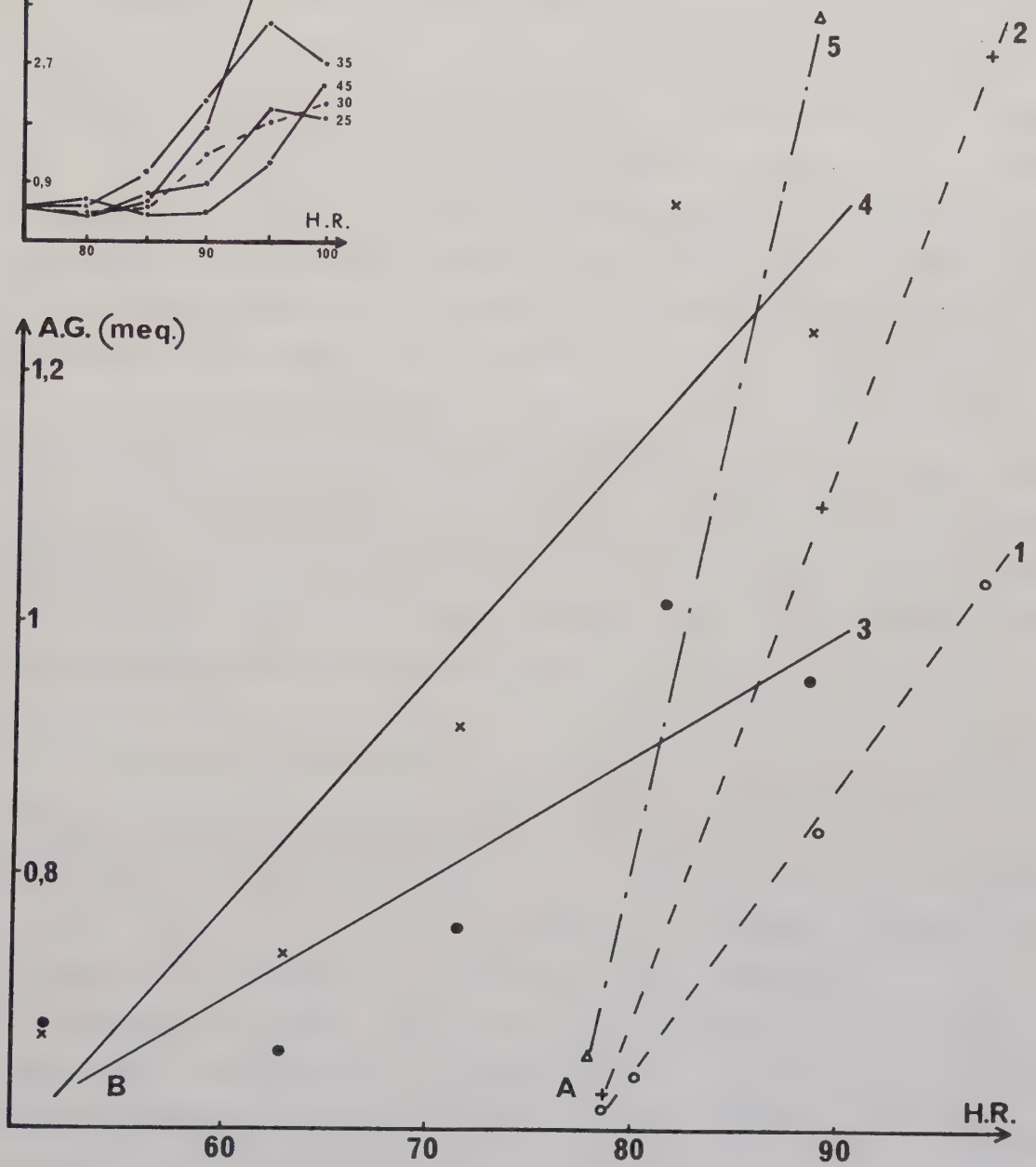


Fig. 29 : Evolution de l'acidité "grasse" de blés selon l'humidité relative, la température et la durée de stockage.

Ainsi, pour les stockages 68-25, les droites 1 (37 j) et 2 (130-150 j) convergent au point A pour une H.R. ≠ 80 %, tandis que pour les stockages 68-30, les droites 3 (138 j) et 4 (179 j) convergent en B pour une H.R. ≠ 50 %. La pente des droites de régression augmente selon les durées de stockage.

En outre, nous avons reporté sur la fig. 29 les valeurs d'A.G. représentées sur la fig. 28 dans le cas du stockage effectué à + 25°C sur du blé de variété P'tit Quinquin récolté en 1962, lorsque l'A.G. devient stable, c'est-à-dire après les 40 premiers jours du stockage expérimental (droite 5). Nous avons reporté ce seul cas afin de pouvoir comparer avec le stockage 68-25. Il apparaît que la droite 5 converge comme les droites 1 et 2, pour une H.R. ≠ 80 %, avec une pente très voisine, ce qui confirme nos résultats. Cependant, les valeurs d'A.G. apparaissent plus importantes avec le blé récolté en 1962, ce qui provient vraisemblablement des conditions de récolte.

Ces différents résultats permettent de conclure qu'à une température donnée de stockage, l'accroissement d'A.G. est directement lié, dans la limite des conditions expérimentales, à l'H.R. à laquelle se trouve stocké le blé. Les valeurs d'H.R. entre lesquelles cette liaison a été mise en évidence sont, selon les stockages :

- à + 30°C : H.R. = 50-60 % comme seuil d'accroissement ; 85-90 % d'H.R. représentant la limite extrême étudiée ;
- à + 25°C : H.R. = 75-80 % comme seuil d'accroissement ; 95-100 % d'H.R. représentant la limite extrême étudiée.

Sur la fig. 29 est également représenté un diagramme tiré d'un travail effectué par BOTTOMLEY et al. (1950). Il s'agit d'une expérience de conservation de maïs où l'évolution de l'A.G. a été suivie en fonction de l'H.R. et de la température. Les auteurs expliquent la décroissance de l'A.G. observée entre 95 et 100 % H.R. à 35°C, par les fluctuations de la population fongique, et situent le seuil d'accroissement d'A.G. entre 80 et 85 % d'H.R., quelle que soit la température. Il y a lieu de souligner que les déterminations d'A.G. n'ont été effectuées qu'après 12 j de stockage. On peut supposer que si les auteurs avaient continué leur expérience, des seuils d'accroissement d'A.G. différents selon la température, en fonction de l'H.R., auraient pu être décelés.

3-3- Caractéristiques de la fraction lipidique des grains présentant une acidité "grasse" élevée par rapport à celle du témoin.

Ainsi que nous l'avons précédemment souligné (page 47), l'acidité extraite par l'alcool peut avoir d'autres origines que la libération des acides gras des triglycérides, bien que ceux-ci en constituent généralement l'essentiel. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de procéder à un sondage semi-quantitatif en comparant les constituants de la fraction lipidique des blés témoins à ceux des échantillons provenant des essais 68-25-95 et 67-25-95 après 132 jours de stockage.

Si l'on considère que la totalité de l'acidité mesurée dans les échantillons 67-25-95 et 68-25-95 après 132 jours de stockage (soit respectivement 2,25 meq. et 1,5 meq. % g de S.S.) correspond à la libération d'acides gras, ces valeurs exprimées en acide linoléique représentent 0,6 g et 0,4 g pour 100 g de S.S., soit environ 20 à 30 % des lipides totaux du blé, dont la quantité est de l'ordre de 3 % S.S. Ces chiffres témoignent d'une activité lipolytique non négligeable.

Les lipides de ces divers échantillons ont été extraits par l'hexane, au soxhlet, puis séparés par chromatographie en couche mince sur gel de silice (phase mobile : hexane 60, éther éthylique 40, ac. formique 1). Après révélation à l'iode, la fraction des triglycérides apparaît en proportion plus importante dans les blés témoins que dans les blés stockés.

Les acides gras isolés sur chromatoplaques ont été, après localisation, élués et estérifiés, puis séparés par chromatographie en phase gazeuse. La proportion d'acide palmitique apparaît plus importante dans les témoins que dans les échantillons altérés après stockage. C'est l'inverse qui est observé pour l'acide oléique ; aucune différence significative n'est relevée en ce qui concerne l'acide linoléique.

Enfin, par examen des spectres d'absorption U.V. des extraits au cyclohexane, les peroxydes lipidiques (230 nm) et les produits résultant de leur dégradation (270 nm) ont été décelés en quantité normale et équivalente dans les échantillons des blés témoins et altérés. Ces résultats, encore incomplets, ne nous permettent pas actuellement de tirer des conclusions.

Par ailleurs, les chromatogrammes correspondant aux échantillons de blé altérés et examinés sous U.V. sans révélation préalable,

montrent une tache de fluorescence jaune verdâtre qui n'existe pas chez les témoins. Cette tache a un Rf de 0,31 et se situe entre les diglycérides 1-3 (Rf : 0,23) et les acides gras (Rf : 0,41).

Selon des recherches récentes (DAFTARY et al., 1970 a et b ; POMERANZ, 1971), cette substance, vraisemblablement produite par les micro-organismes, est composée de deux stérols ; le principal stérol étant le 4,6,8 (14), 22, ergostatetraen - 3 one et son homologue éthylé en C24.

3-4- Conclusion.

Lors des stockages expérimentaux étudiés, l'acidité "grasse" extractible par l'alcool s'accroît d'autant plus sensiblement que le blé se trouve à une teneur en eau plus élevée. Il semble exister un seuil d'H.R., fonction de la température, au-dessous duquel cette acidité demeure constante ou n'évolue que très lentement au-delà d'un certain temps de latence. Ce seuil se situe vers 50-60 % d'H.R. à + 30°C et vers 75-80 % d'H.R. à + 25°C, ce qui correspond à des teneurs en eau du grain de, respectivement, 14 % S.S. et 18 % S.S.. Au-delà des seuils ainsi définis, la vitesse d'acidification croît avec l'H.R. et la température, la quantité d'acides libérée atteignant une limite d'autant plus élevée que l'humidité relative est plus forte.

Ces résultats sont à rapprocher, dans une certaine mesure, des observations rapportées par GLASS et al. (1959). Ces auteurs mettent en évidence, à 30°C et à une H.R. voisine de 74 %, un accroissement sensible d'A.G. coïncidant avec une augmentation considérable du nombre de micro-organismes. Cependant, sous atmosphère d'azote, donc sans développement fongique, et toutes autres conditions égales par ailleurs, une certaine augmentation d'A.G. est également notée.

On peut faire l'hypothèse qu'aux moyennes H.R., la légère acidification observée provient surtout de l'action de la lipase du blé, alors qu'aux plus fortes H.R., au-delà du seuil observé, qui correspond d'ailleurs sensiblement à l'apparition de"l'eau solvante", la lipase sécrétée par les micro-organismes qui se développent sur les grains joue un rôle très important. Il conviendrait donc d'examiner l'activité lipolytique des principales espèces de moisissures proliférant sur le grain.

Un point mérite également d'être souligné. ACKER et BEUTLER (1963-1965) et CAILLAT (1970) ont montré que, dans un milieu modèle

obtenu par mélange d'une préparation présentant une activité lipolytique avec un substrat de triglycérides liquides, la libération d'acides gras observée même pour de très faibles H.R. et, pour une valeur d'H.R. donnée, est proportionnelle au temps. Le substrat liquide assurerait, dans ce cas, le renouvellement des contacts enzyme-substrat. Dans les essais que nous avons effectués, nous avons montré par contre l'existence d'un seuil d'humidité relative au-dessus duquel apparaît une acidification importante, et que l'acidité libérée atteint une limite pour une H.R. donnée.

Nous pensons qu'il convient d'attribuer ces différences d'évolution au fait que, contrairement au milieu modèle étudié, le grain présente une structure cellulaire qui limite les contacts enzyme-substrat, même aux humidités relatives élevées où la lipase est vraisemblablement d'origine fongique. La réaction resterait localisée aux points de contact de l'enzyme avec les lipides de certaines parties du grain.

En conclusion, il apparaît que la mesure globale d'acidité "grasse" libérée peut, au moins entre certaines limites de température et d'humidité, constituer un test d'appréciation de l'état d'altération du grain.

Cependant, la résultante ainsi mesurée mériterait d'être analysée plus en détail pour mieux préciser les diverses causes d'acidification observée.

4- EVOLUTION DE LA MICROFLORE DU BLE.

4-1- Evolution des bactéries.

Seuls quelques sondages ont été effectués sur le dénombrement des bactéries. Ce sont les moisissures qui constituent la cause essentielle des détériorations d'origine microbienne dans les grains stockés, en atmosphère ventilée (cf. travaux antérieurs).

Les déterminations que nous avons obtenues montrent que le nombre de bactéries mésophiles croît pour atteindre une valeur de 7×10^8 germes par g après quelques jours de stockage à une H.R. de l'ordre de 95 % et à 30°C. Après la phase de croissance exponentielle, le nombre de bactéries décroît rapidement pour devenir négligeable au-delà de 100 à 150 jours de stockage. A des H.R. ou des températures plus basses, leur nombre diminue : ainsi, à 15°C et malgré une H.R. élevée de l'ordre de

95 %, la quantité de bactéries évolue de 10^7 à 10^6 germes par g après 150 jours de stockage. Au-dessous de 90 % d'H.R., nous n'avons pas noté de développement de bactéries mésophiles.

4-2- Evolution des moisissures.

4-2-1- Evolution quantitative.

La fig. 30 montre, en fonction de la durée de stockage, l'évolution quantitative des moisissures totales aux températures de 15, 25 et 35°C, et à différentes H.R. Elle est établie à partir de données inédites communiquées par POISSON et GUILBOT (1963 b) et des résultats partiels que nous avons obtenus lors de certains des stockages réalisés.

A partir de l'ensemble de nos résultats et dans nos conditions expérimentales, on observe que le nombre de moisissures croît de façon considérable lorsque la température et l'humidité sont suffisamment importantes. On note, en effet, après 50 à 100 jours de stockage, à des températures de 25, 30 et 35°C, un accroissement du nombre de moisissures allant de 10^4 à 10^{10}-10^{11} germes par g aux H.R. de l'ordre de 95-97 %. Au-delà de cette période, le nombre de moisissures se stabilise. A une H.R. voisine de 80 %, toutes autres conditions égales par ailleurs, le nombre de moisissures atteint 10^6 à 10^7 germes par g. Enfin, à ces mêmes températures et après une certaine durée de stockage, on note que plus l'H.R. est basse, plus la population fongique diminue. Par exemple, à 25°C et 70 % d'H.R., après 200 jours de stockage, le nombre de germes par g est de 10^3.

Par contre, à une température plus basse, de l'ordre de 15°C, mais pour des H.R. comprises entre 75 et 85-90 %, le nombre de moisissures s'accroît pour atteindre 10^5 à 10^6 germes par g après 50 jours de stockage, puis il se stabilise. A une H.R. plus élevée, ce nombre dépasse les 10^7 germes par g.

4-2-2- Evolution qualitative de la population fongique au cours des stockages expérimentaux.

Dans les zones de températures favorables à leur développement, aux fortes humidités, on note que les espèces champêtres : Cephalosporium, Verticillium, Fusarium, Alternaria, et surtout Cladosporium, se multiplient, ainsi que les espèces de stockage, et en particulier les

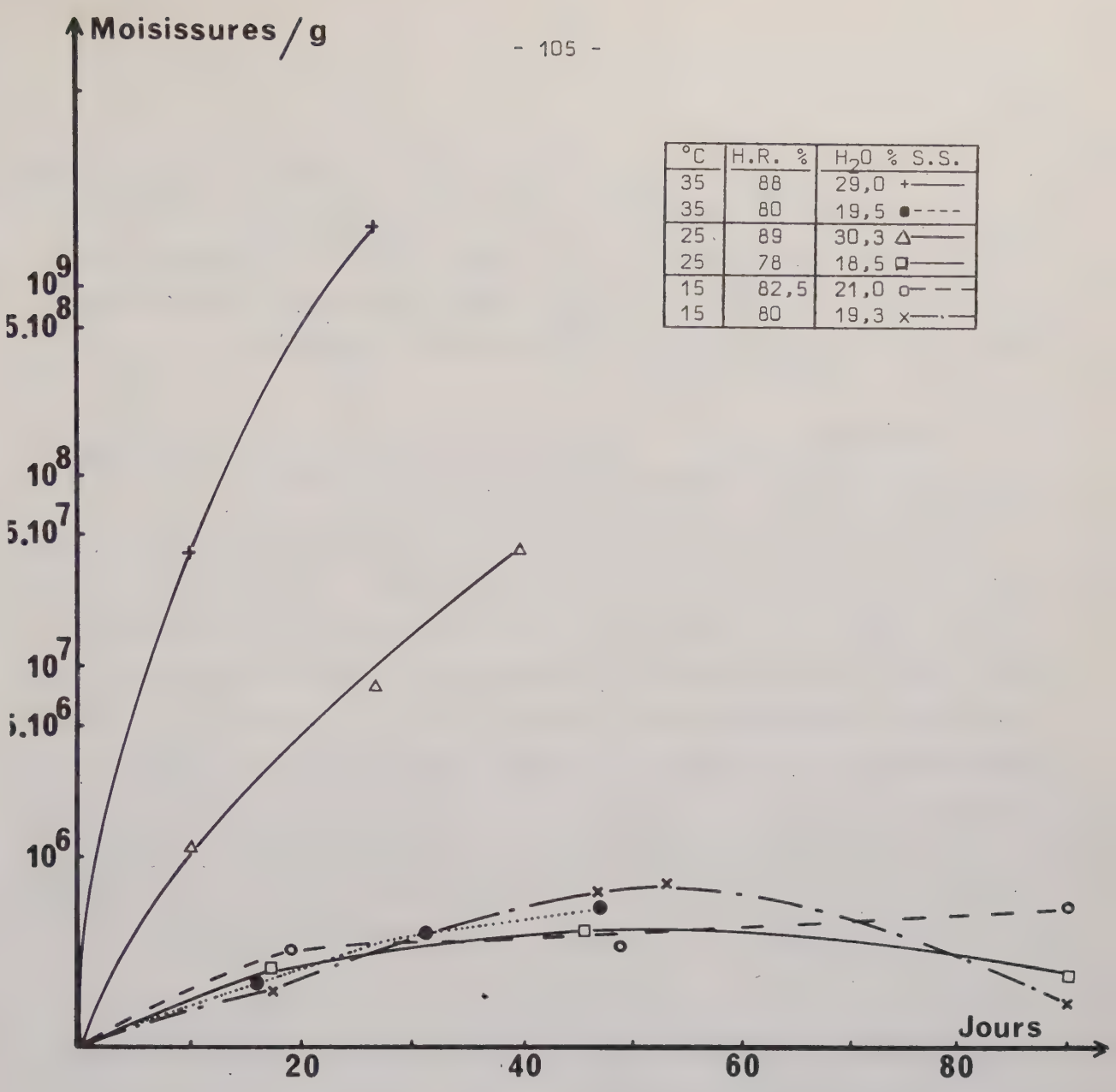


Fig. 30 : Evolution du nombre de moisissures par g de grains,en fonction de la durée de stockage, de blés conditionnés à différentes H.R. et températures.

Aspergillus (A. amstellodami) et les Penicillium (notamment P. oxalicum). Aux H.R. relatives de l'ordre de 75 à 80 %, les Aspergillus et Penicillium sont prédominants. Parmi les Aspergillus, les groupes A. glaucus, A. candidus, A. ochraceus et plus rarement A. versicolor et A. niger sont représentés ; parmi les Penicillium, on a pu mettre essentiellement en évidence P. notatum et P. brevi-compactum.

Mais le fait le plus marquant est la présence et la prédominance des Aspergillus à une H.R. de l'ordre de 60%, et à 25-30°C, à la limite du développement des moisissures, limite qui coïncide avec l'apparition d'eau "solvante" ; dans ces conditions, on a noté la présence d'Aspergillus du groupe des A. glaucus. A.H.R. élevée, de l'ordre de 90%, mais à 15°C, on a pu mettre en évidence quelques Penicillium.

A la fin des stockages expérimentaux, quelques sondages ont été faits pour déceler la présence éventuelle d'aflatoxine et d'A. flavus. Il est apparu que, seulement pour le stockage 62-25-95, on a dénombré de l'ordre de 4×10^5 germes par g de A. flavus ; cependant, aucune trace d'aflatoxine B_1, B_2, G_1 ou G_2 n'a pu être mise en évidence.

4-3- Conclusion.

Le développement des bactéries ne semble pas intervenir dans l'altération du grain, sauf aux H.R. très élevées.

Par contre, dans la zone des H.R. supérieures à 75-80 % et au moins jusqu'à 35°C, limite de température étudiée, les moisissures se multiplient d'autant plus rapidement que la température et la teneur en eau sont élevées. En dessous de la zone hydrique de non prolifération, c'est-à-dire entre approximativement 60 et 70 % d'H.R., leur nombre est fonction décroissante de ces facteurs, le facteur hydratation étant cependant prédominant.

Au point de vue qualitatif, on note la meilleure résistance, à faible H.R. mais à température moyenne, des espèces Aspergillus par rapport aux Penicillium.

5- CARACTERISTIQUES TECHNOLOGIQUES DE LA FARINE ISSUE DES BLES STOCKES.

5-1- Les alvéogrammes Chopin.

La figure 31 présente, par rapport à l'alvéogramme de la farine du blé témoin, des alvéogrammes de farines extraites de blés entreposés dans différentes conditions de température, d'H.R. et de durée.

Nous avons reporté sur le tableau XIX les principales caractéristiques de ces alvéogrammes (P : ténacité ; L : extensibilité ; W : travail).

D'après le tableau XIX, il apparaît que :

- les modifications de l'alvéogramme sont d'autant plus rapides que la température et la teneur en eau sont plus élevées ;
- au début, ces modifications correspondent à une amélioration des qualités rhéologiques de la farine (W en augmentation), sans que le rapport P/L soit trop élevé ($< 0,70$) ;

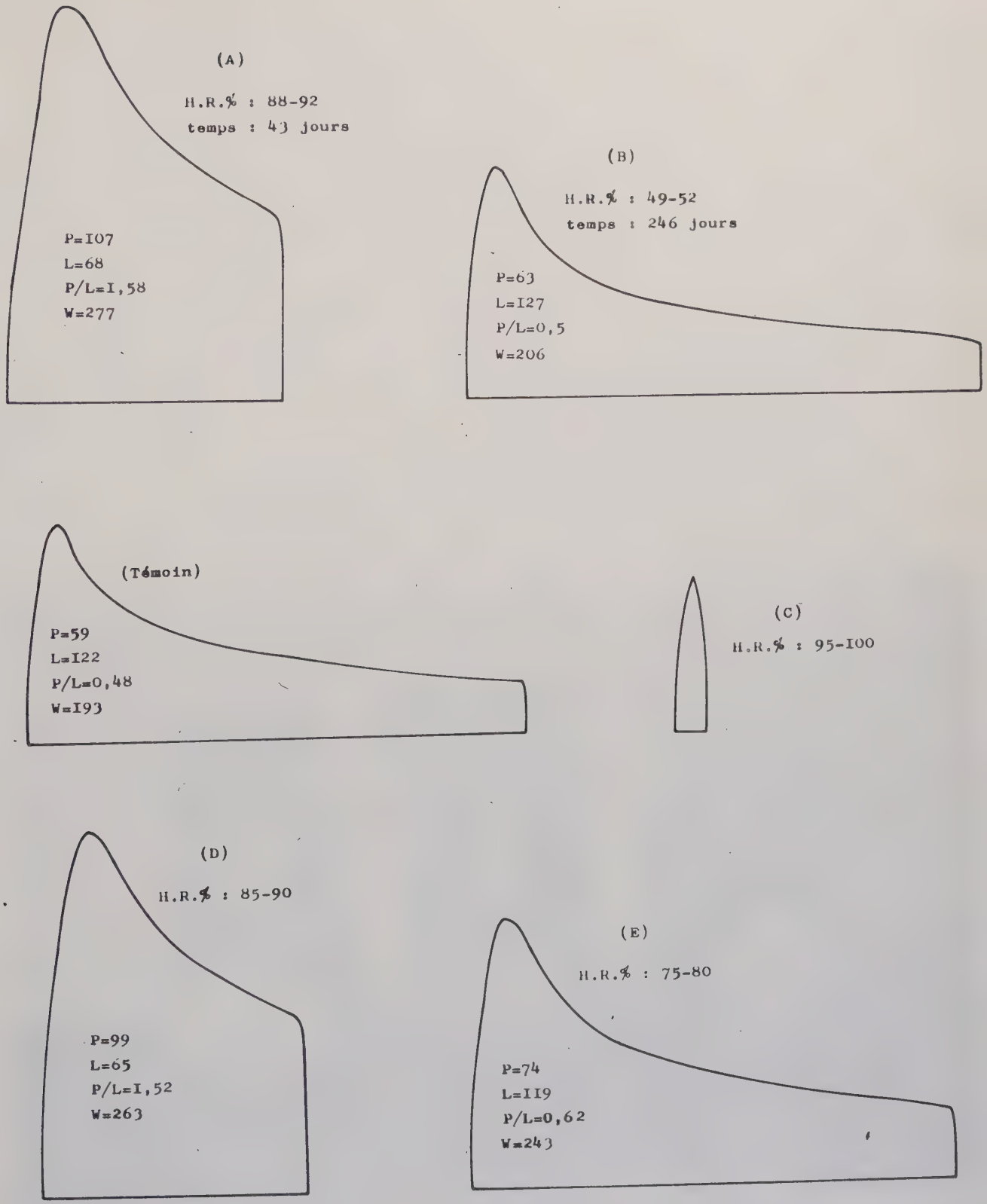


Fig. 31 : Alvéogrammes Chopin réalisés à partir de blé de variété Cappelle récolté en 1968, stocké à différentes températures, humidités relatives et durées de stockage, en comparaison avec celui du même blé témoin.
(A) et (B) : stockages à + 30°C
(C), (D) et (E) : stockages 132 j à + 25°C

P : ténacité
L : extensibilité
W : travail

Fig. 32:

Photographie de trois pains (teinte sombre) issus de farine de blé de variété Capelle récolté en 1968, stocké à 25°C à 95-100% d'H.R. pendant 132 jours, et dont la pâte a été mise à fermenter pendant trois temps différents. Sont présentés aussi trois pains (teinte claire) obtenus à partir du même blé non conditionné et dont la pâte a été mise à fermenter pendant les trois mêmes temps.

- par la suite, l'extensibilité des farines décroît progressivement tandis que la ténacité augmente de façon importante ; cette évolution est d'autant plus rapide que l'hydratation et la température sont plus élevées.

Ces résultats sont en bon accord avec les quelques travaux précédemment effectués, en particulier par GUILBOT et POISSON (1963), STAWICKI et KAMINSKI (1965) et SPICHER (1968).

TABLEAU XIX - Caractéristiques des alvéogrammes Chopin obtenus à partir de farines de blés stockés à différentes H.R. et températures pendant des temps variables, par rapport à celles de l'alvéogramme de la farine extraite du blé témoin.

P : ténacité ; L : extensibilité ; W : travail

P/P_t, L/L_t ... : ténacité, extensibilité ... par rapport à celle du témoin

T : blé "témoin" de variété Cappelle récolté en 1968

A : stockage à 30°C, 43 jours et 88-92 % d'H.R.

B : " " 246 " " 49-52 % "

D : " 25°C, 132 " " 85-90 % "

E : " " " " " 75-80 % "

	P	P/P_t	L	L/L_t	P/L	$\frac{P/L}{P_t/L_t}$	W	W/W_t
T	59		122		0,48		193	
A	107	1,81	68	0,56	1,58	3,29	277	1,43
B	63	1,07	127	1,04	0,50	1,04	206	1,07
D	99	1,68	65	0,53	1,52	3,17	263	1,36
E	74	1,25	199	0,97	0,62	1,29	243	1,26

5-2- Essai de cuisson standardisé.

Nous avons reporté sur le tableau XX les principales caractéristiques des pains fabriqués avec les farines extraites des blés conditionnés (68-30-50, B, après 246 jours de stockage ; 68-25-95, C, 68-25-85, D et 68-25-75, E, après 132 jours de stockage) ; ainsi que les caractéristiques du pain obtenu à partir de la farine du blé témoin.

TABLEAU XX - Principales caractéristiques des pains obtenus à partir des farines extraites de blés stockés à différentes humidités relatives et températures, pendant des temps variables, par rapport à celles du pain préparé avec de la farine du blé témoin.

C : Blé de variété Cappelle récolté en 1968, stocké à 25°C et 95-100 % d'H.R. pendant 132 jours.

Pour les autres modes de stockage, la légende est identique à celle qui figure au tableau XIX.

	Affaiblissement de la pâte		Volume du pain (en cm^3)		Volume spécifique du pain	
	en valeur absolue	par rapport au témoin	en valeur absolue	par rapport au témoin	en valeur absolue	par rapport au témoin
T	55	-	0,346	-	2,92	-
B	30	0,55	0,361	1,04	3,04	1,04
C	320	5,81	0,217	0,63	1,85	0,63
D	60	1,09	0,357	1,03	3,06	1,05
E	20	0,36	0,372	1,08	3,20	1,09

On observe que :

- moins l'affaiblissement de la pâte est prononcé, meilleur est le volume du pain ;
- le volume du pain issu de blés conditionnés, rapporté au volume du pain obtenu à partir du blé témoin, est très identique au rapport des volumes spécifiques ; le poids du pain ne semble donc pas une mesure significative ;
- d'une manière générale, il apparaît que, selon les conditions de stockage, les fluctuations du volume du pain sont identiques à celles de l'alvéogramme Chopin ; par exemple, lorsque le W est en augmentation par rapport au W témoin, le volume du pain est aussi en accroissement par rapport au volume du pain issu du blé témoin ; cependant, lorsque la farine, donc le blé, est très détériorée, la mesure de l'alvéogramme est plus sensible que celle du volume du pain ; ainsi, dans le cas du stockage 68-25-95 (C), on ne peut donner une valeur au W alors que la panification en moule est à la rigueur encore réalisable.

La fig. 32 présente les photographies comparées du pain obtenu dans ce dernier cas et du pain obtenu à partir du blé "témoin". Le premier

pain issu de la farine de blé stocké présente encore une certaine texture ; cependant, le produit est de couleur sombre, "pain d'épice". La pâte très molle, grisâtre, impossible à "tourner" a dégagé une odeur de moisi.

5-3- Conclusion.

Il existe une certaine similitude entre le rapport de l'alvéogramme d'une farine de blé stocké à celui de la farine du blé témoin, et le rapport des volumes des pains résultant de ces farines (cf. tabl. XX, stockages B, D et E).

Le fait marquant qui se dégage de l'étude de l'alvéogramme Chopin et de l'essai de cuisson est le passage par un optimum, en fonction du temps, des qualités plastiques de la farine, optimum qui apparaît d'autant plus rapidement que le blé est stocké à une humidité et une température plus élevées. Cette amélioration peut être due, au moins pour une part, ainsi que le soulignent GUILBOT et POISSON (1963) pour le stockage en atmosphère confinée, à l'action de certains produits de la fermentation ; on sait en effet que l'acétaldéhyde et l'alcool, par exemple, augmentent dans une certaine mesure les qualités boulangères d'une farine. Cependant, dans nos conditions en atmosphère renouvelée, d'autres mécanismes peuvent intervenir dans cette évolution. Il conviendra de développer des recherches dans cette voie.

Il est du reste intéressant de signaler que, au cours de stockages expérimentaux que nous avons effectués dans des conditions similaires avec du café vert (CORTE DOS SANTOS et al., 1971), on a également observé le passage par une valeur optimale des qualités organoleptiques de la boisson obtenue après torréfaction.

6- DISCUSSION ET CONCLUSION.

A partir des résultats obtenus, il apparaît déjà qu'il est très difficile d'utiliser l'évolution de l'activité RNA-asique comme test de conservation. Il n'en est pas de même en ce qui concerne la détermination du temps moyen de germination. Par ailleurs, les autres déterminations réalisées sur les blés en cours de stockage présentent une évolution susceptible, à des degrés divers, de caractériser l'état d'altération du grain. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de comparer deux à deux

les critères étudiés au cours de cette recherche en prenant un test comme dénominateur commun : l'acidité "grasse", pour établir entre eux certaines corrélations et définir le test d'altération le plus approprié dans des conditions données.

6-1- Evolution de l'A.G. extractible en fonction de la C.g.

Nous avons étudié la corrélation entre la C.g. et l'acidité "grasse". Dans le cadre de nos essais, bien que l'interprétation statistique soit aléatoire, car le nombre de déterminations d'acidité "grasse" est très réduit, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XXI et sur la fig. 33.

TABLEAU XXI - Analyse de la liaison entre l'évolution de la capacité germinative et l'évolution de l'acidité "grasse", dans le cas de stockages effectués à + 25°C et + 30°C et à différentes humidités relatives, avec un blé Cappelle récolté en 1968.

Stockages considérés	68-30-90 (1)	68-30-80 (B)	68-30-70	Ensemble (inclus 68-25-75)
nombre de d.d.l.	4	6	3	20
r expérimental	0,8684	0,9492	0,6176	0,7822
r (1 %	0,9172	0,8343	0,9587	0,5368
r (5 %	0,8114	0,7067	0,8787	0,4227
pente droite : a x 10^3	- 3,47	- 1,84	- 1,63	- 2,65

Il apparaît que :

- une corrélation linéaire hautement significative existe entre l'accroissement de l'A.G. et la diminution de la C.g. ; cependant, l'A.G. continue d'augmenter alors que la C.g. est nulle;
- les pentes des droites de régression paraissent dépendre des conditions expérimentales ($-3,47 \times 10^{-3}$ pour le stockage A et $-1,84 \times 10^{-3}$ pour le stockage B) ; en outre, pour le stockage 67-25-95, on a obtenu des taux très élevés d'acidité de 2,08 à 2,24 correspondant respectivement à des C.g. de 7 et 2 %, mais ces seules données sont insuffisantes pour calculer un coefficient de corrélation.

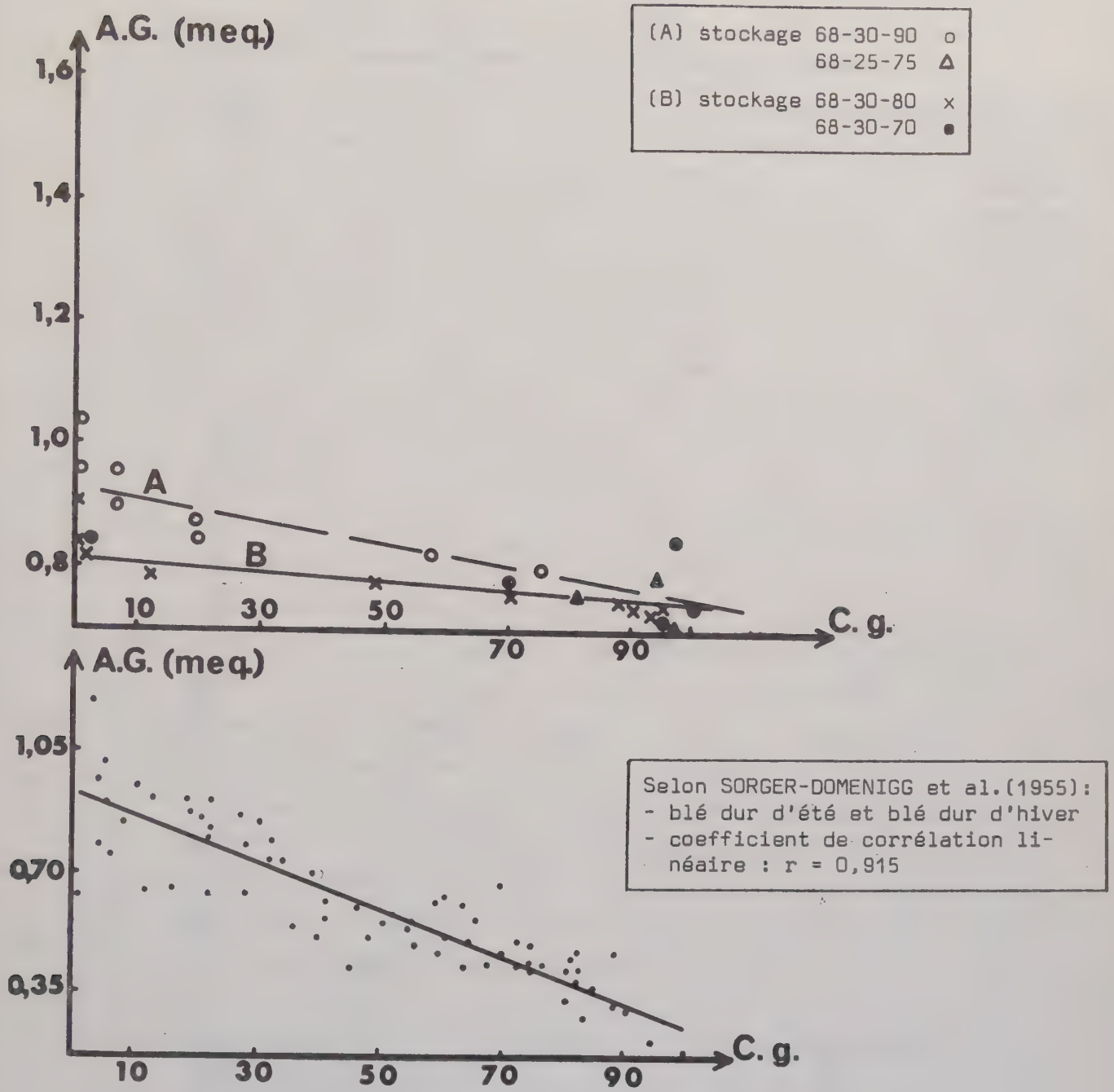


Fig. 33 : Relation entre capacité germinative et acidité "grasse" sur blé.

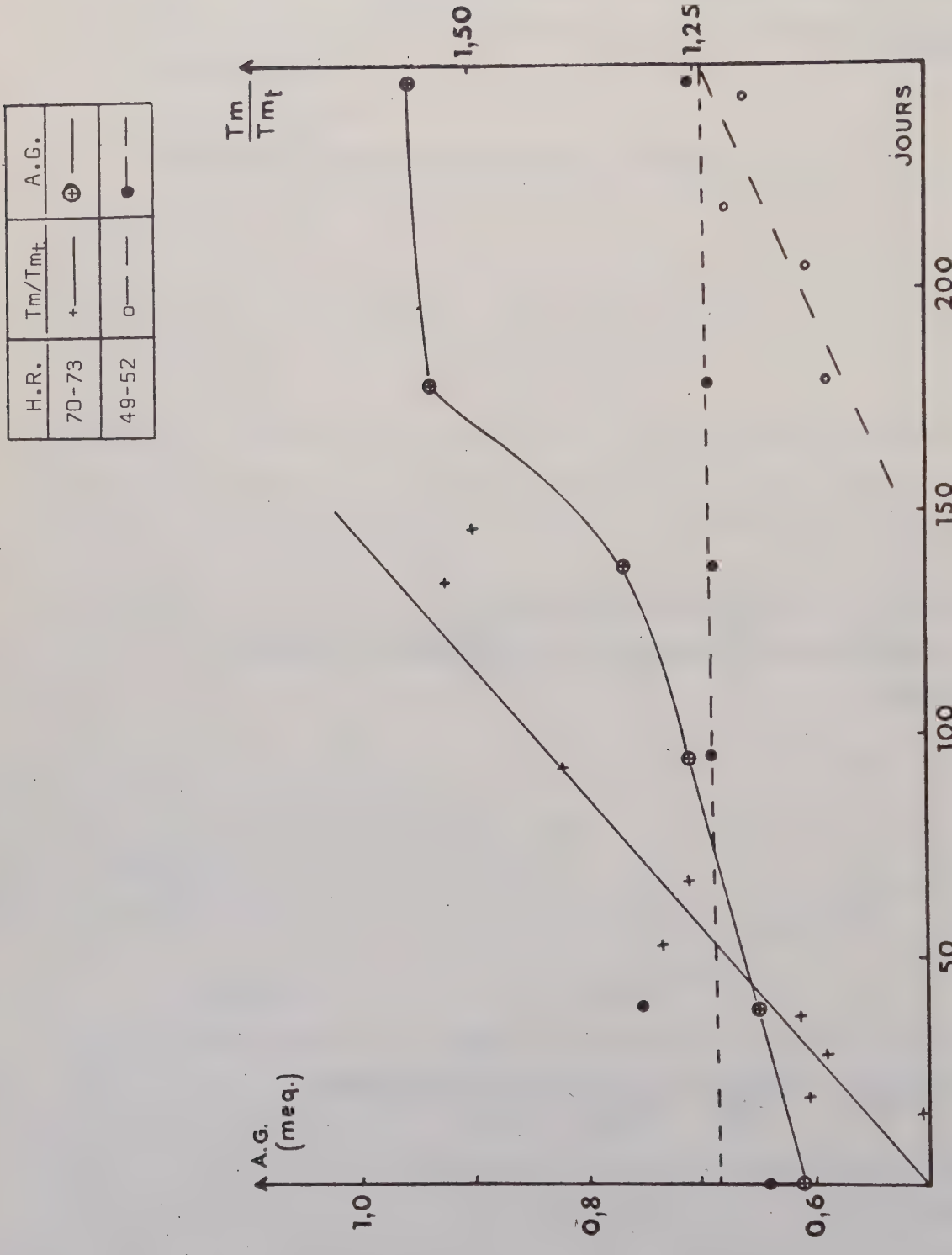


Fig. 34 : Evolution de l'acidité "grasse" et du rapport temps moyen de germination sur celui du témoin de blé variété Cappelle, récolté en 1968, stocké à deux humidités relatives différentes, à 30°C, en fonction de la durée de stockage.

Ces résultats confirment et précisent, dans une certaine mesure, ceux de SORGER-DOMENIGG et al. (1955). Ces auteurs ont établi (fig. 33) une corrélation hautement significative entre C.g. et acidité "grasse" (r = 0,915 pour r 1 % = 0,31 à 66 d.d.l.) sans spécifier la pente de la droite de corrélation qui, graphiquement, a une valeur approximative de $-0,64 \times 10^{-3}$, ni les conditions expérimentales d'évolution de la C.g. de 0 à 100 %. Cette étude a vraisemblablement été réalisée à partir de lots de grains commercialisés peu humides, et d'origines variées, et non à partir de stockages expérimentaux effectués avec un blé déterminé. Il apparaît donc très probable que la droite de régression mise en évidence par SORGER-DOMENIGG et al. est la résultante de multiples corrélations.

6-2- Evolution de l'A.G. et du rapport Tm/Tm_t en fonction de la durée de stockage.

Nous avons représenté sur la fig. 34 l'évolution comparée de l'A.G. extractible et du rapport Tm/Tm_t en fonction de la durée, dans le cas des stockages 68-30-70 et 68-30-50.

L'examen de la fig. 34 montre que :

- dans le cas du stockage 68-30-70, l'accroissement du rapport Tm/Tm_t est plus rapide et plus précocement décelable que l'accroissement de l'A.G. ;
- dans le cas du stockage 68-30-50, alors que l'A.G. reste constante, le rapport Tm/Tm_t augmente de façon très significative.

Il apparaît donc que, au moins dans nos conditions expérimentales, la mesure du Tm est plus sensible que la détermination de l'A.G. pour déceler les premiers stades de l'altération. En outre, on peut dire que l'A.G. ne semble pas être le facteur déterminant pour le début d'altération décelé par l'accroissement du rapport Tm/Tm_t.

6-3- Evolution de l'A.G. et du nombre de moisissures en fonction de la durée de stockage.

Nous avons établi, fig. 35, la corrélation existante entre l'A.G. extractible et le nombre de micro-organismes, toutes choses égales par ailleurs.

Il apparaît que, dans la limite de nos conditions expérimentales et quelles que soient la température et l'H.R. de stockage, il existe une relation bilogarithmique entre l'A.G. et le nombre de micro-organismes. Cette relation vient étayer l'hypothèse précédemment formulée : la lipase

sécrétée par les micro-organismes qui se développent sur le grain, puis dans le grain, joue un rôle primordial dans le développement de l'acidité "grasse" extractible.

6-4- Discussion des résultats obtenus.

L'étude que nous avons entreprise aboutit à dégager un certain nombre de résultats sur l'évolution de l'altération du blé, mesurée par quelques tests choisis au cours de stockages expérimentaux en atmosphère renouvelée.

Nous avons pu souligner les observations préliminaires suivantes :

- s'il est difficile d'utiliser les fluctuations d'activité RNA-asique comme test de conservation, il nous est apparu qu'il serait du plus grand intérêt d'étudier la RNA-ase et ses effecteurs éventuels ;
- il existe une relation entre l'évolution de l'A.G. et le nombre de micro-organismes. Compte tenu de celle que nous avons établie entre la quantité de moisissures et l'acidité "grasse", nous pouvons dire qu'il existe une liaison entre la diminution de la C.g. et l'accroissement du nombre de moisissures. Cette liaison est vraisemblablement plus causale que celle établie entre C.g. et A.G.

Nous avons reporté, sur la fig. 36, l'évolution du rapport Tm/Tm_t, de l'A.G. extractible et de la C.g., en fonction de la durée de stockage de blés conditionnés à différentes températures et H.R. Il est donc possible de déceler après combien de temps un changement significatif se produit selon les tests utilisés. Il apparaît que, dans tous les cas, le rapport Tm/Tm_t évolue plus précocement que la diminution de la C.g., cette dernière fluctuant plus rapidement que l'accroissement d'A.G. extractible.

Sur la fig. 37, nous avons porté la variation de Tm (et non de Tm/Tm_t) en fonction de la C.g. des lots de grains. On constate, selon le traitement du grain (stocké à différentes H.R. et températures, après des temps variables), une variation importante de Tm alors que la C.g. demeure sensiblement constante, et supérieure à 75-80 %. On peut ainsi déceler un début d'altération du grain, indiscernable par la mesure de la C.g.

L'ensemble de ces observations nous permet de dire que le temps moyen de germination constitue, dans les limites de nos conditions expérimentales, un test plus sensible que les autres tests employés, afin de

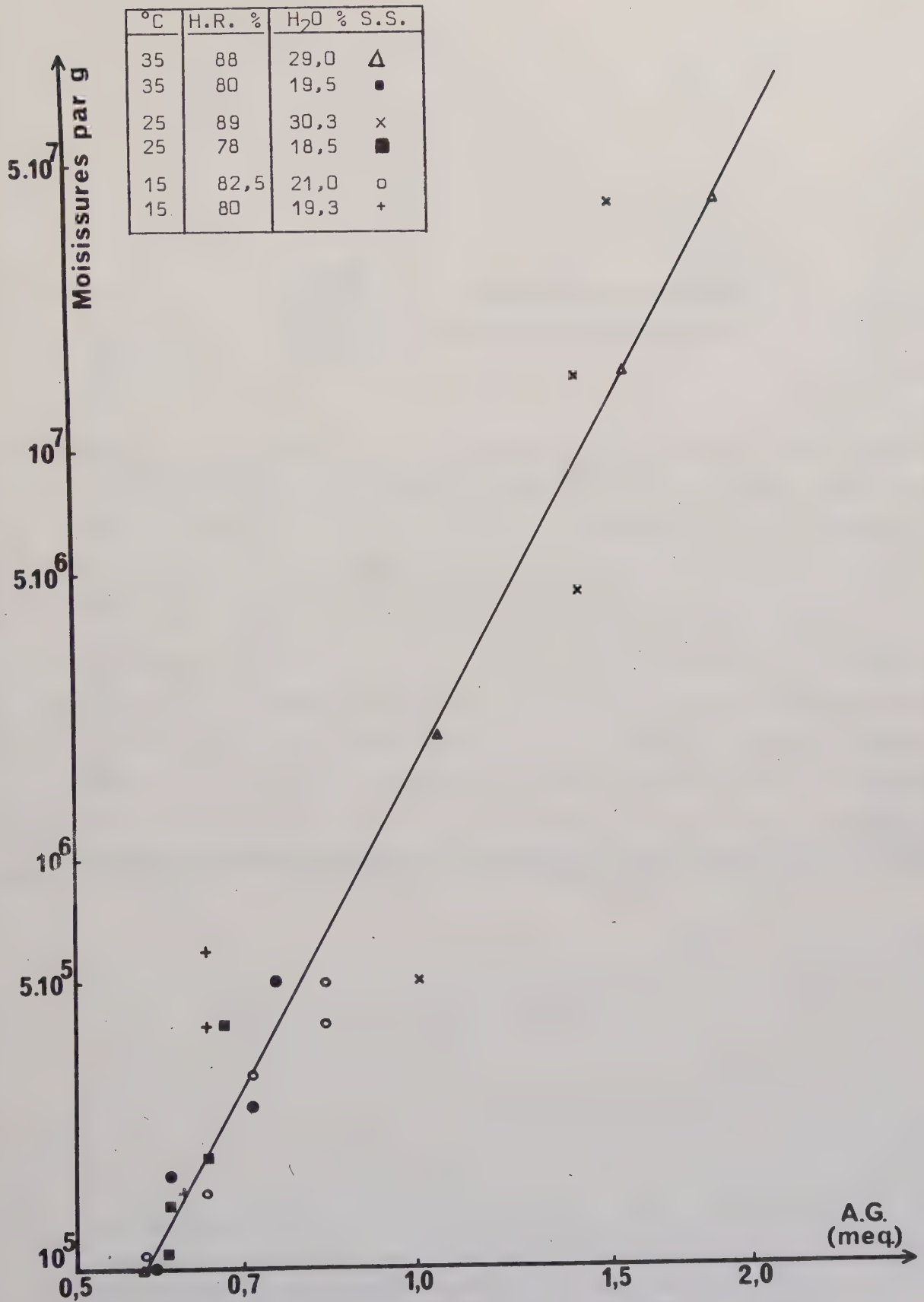


Fig. 35 : Evolution du nombre de moisissures par g de grains en fonction de l'acidité "grasse" extractible à différentes températures et H.R. de stockage.

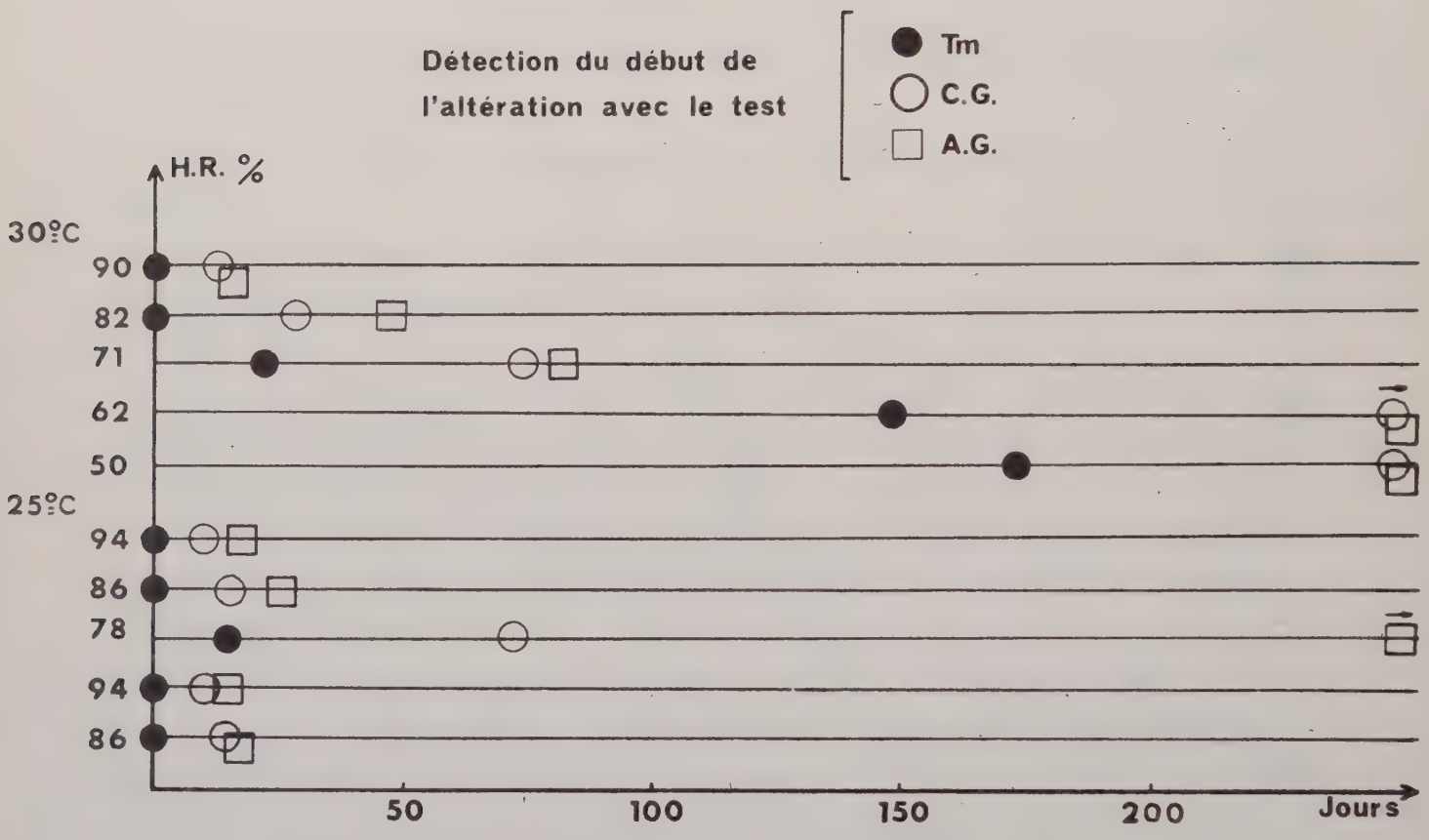


Fig. 36 : Evolution du rapport du temps moyen de germination sur celui du témoin, de l'acidité "grasse" extractible et de la capacité germinative en fonction de la durée de stockage de blés conditionnés à différentes températures et humidités relatives.

Variété	t de stockage	H.R. %
Cappelle 1968	30°C	90 □
		80 ×
		70 ●
		60 +
		50 o
Cappelle 1968	25°C	95 ■
		85 ⊗
Cappelle 1967		95 ⊕
		85 △

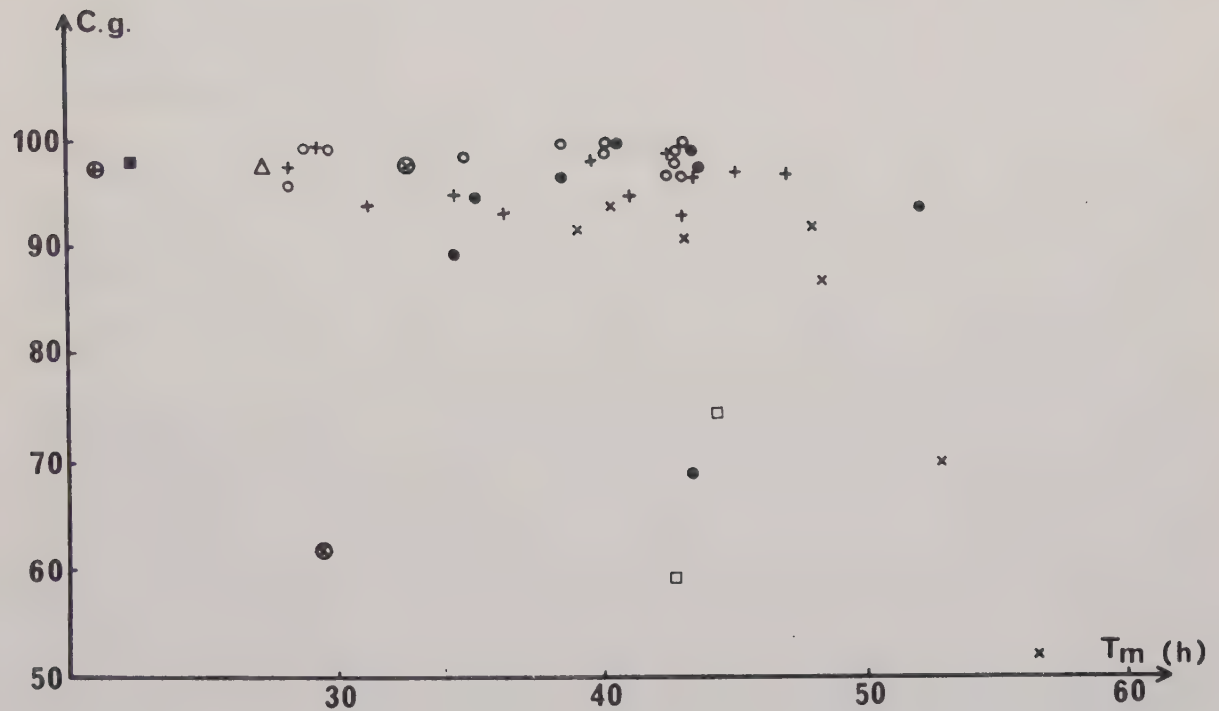


Fig. 37 : Evolution de la capacité de germination et du Tm de germination au cours de stockages expérimentaux.

déceler globalement un début d'altération. Il y a lieu de nuancer cette affirmation en rappelant que chacun des tests employés rend compte plus particulièrement de l'évolution d'un aspect du métabolisme du grain et de sa flore d'accompagnement.

CONCLUSIONS GENERALES

Le travail expérimental a consisté à soumettre différents lots de blé à des stockages expérimentaux afin d'étudier les réponses de deux tests mis au point récemment, la mesure du temps moyen de germination et celle de l'activité ribonucléasique extractible, en les comparant à celles de déterminations plus classiques, population microbienne et acidité "grasse", ainsi qu'aux variations des caractéristiques rhéologiques et technologiques de la farine extraite du blé.

Le premier test, la mesure du temps moyen de germination (Tm), donne un aspect global de l'état d'altération, en reflétant l'état général des protéines, et notamment des enzymes du grain. Le second, la mesure de l'activité ribonucléasique (RNA-ase), permet d'apprécier au contraire un aspect particulier, celui de l'altération d'un système enzymatique.

Afin de réaliser ces recherches, nous avons été amenés à procéder à l'étude critique des méthodes du temps moyen de germination et de l'activité RNA-asique, ce qui a permis d'y apporter des améliorations et de les adapter à nos conditions expérimentales. Il en a été de même pour les appareillages de stockage en atmosphère renouvelée, à température et hygrométrie constantes.

Ces éléments étant acquis, il nous a été possible, d'une part de dégager un certain nombre de résultats sur l'évolution de l'altération du blé, et d'autre part de mieux préciser l'intérêt des méthodes utilisées connues pour définir le degré d'altération et l'aptitude au stockage du blé.

1- CRITIQUE DES APPAREILLAGES ET METHODES EMPLOYES.

Nous avons été amenés à apporter plusieurs modifications aux appareillages de stockage existants (amélioration des systèmes de chauffage et de détente laminaire de l'air) pour éliminer certains défauts de fiabilité et des variations d'H.R. de l'ordre de ± 2 %. Ces réalisations ont permis d'obtenir, même au cours d'un fonctionnement continu de 594 jours, un coefficient de variation des H.R. mesuré de l'ordre de 1 à 2 %, ordre de grandeur de l'erreur de reproductibilité de l'appareillage de contrôle des H.R.

L'étude critique de l'appareil de germination a montré que les grains germent plus rapidement s'ils sont disposés sur le bord extérieur des plateaux de germination. Il n'a pas été possible jusqu'à présent de préciser la cause de ce phénomène. Cependant, du fait de l'utilisation systématique d'un témoin, les résultats obtenus ne sont pas perturbés et la mesure du Tm s'est révélée être un critère plus sensible que les mesures de capacité et d'énergie germinative.

Les méthodes utilisées ne sont pas à l'abri de toute critique. Ainsi, le dosage de l'activité RNA-asique extractible,tel qu'il est effectué, permet de mettre en évidence l'activité d'hydrolyse de l'ARN ; celle-ci est due principalement à la RNA-ase, mais d'autres enzymes nucléolytiques peuvent également intervenir. Cependant, cette méthode, par sa relative simplicité, permet d'effectuer des dosages en série. Sa reproductibilité dépend essentiellement du soin apporté lors du dosage de l'activité enzymatique de l'extrait, ce qui demande un manipulateur expérimenté.

Cependant, lors des essais de répétabilité des résultats fournis par les méthodes de dosage d'activité RNA-asique, de détermination du temps moyen de germination et de mesure de l'acidité "grasse" extractible, on a mis en évidence des coefficients de variation, respectivement de l'ordre de 4,5 - 3 et 15 %. La précision de la méthode de mesure de "l'activité RNA-asique" s'avère donc nettement meilleure que celle de la mesure de l'acidité "grasse" qui est d'usage courant.

2- RESULTATS OBTENUS LORS DES STOCKAGES EXPERIMENTAUX.

Lors de ces stockages, nous avons mis en évidence une perte de substance sèche qui ne devient sensible qu'après 200 jours environ, aux températures étudiées, lorsque l'H.R. est de l'ordre de 90 %. Cependant, pour le stockage réalisé à 25°C et à une H.R. de 97 %, la perte de substance sèche s'observe dès les premiers jours de l'entreposage.

Compte tenu de ces observations, nous avons présenté les résultats obtenus en les reportant en pour cent de matière sèche, sauf pour les déterminations réalisées à partir du stockage effectué à 97 % d'H.R. et qui, trop aléatoires, n'ont servi que de sondage.

2-1- Activité RNA-asique.

L'activité RNA-asique extractible de blé conservé en atmosphère renouvelée, que ce soit à température ambiante, en chambre froide ou en congélateur, peut varier dans le temps selon une évolution plus ou moins cyclique. En outre, l'activité RNA-asique d'un blé soumis à des conditions de conservation très défavorables (H.R. élevée et température de l'ordre de 25°C) s'accroît sensiblement à la condition que ce blé se trouve dans un certain stade physiologique lié, semble-t-il, à un état de vieillissement du grain. Il semble, par ailleurs, qu'un stockage prolongé à température plus élevée aboutisse à un début d'inactivation thermique de cette enzyme.

Ces observations nous permettent de dire que, s'il est difficile d'utiliser les fluctuations d'activité RNA-asique comme test de conservation, il est par contre du plus grand intérêt, au moins sur le plan théorique, d'étudier les RNA- es du blé et leurs effecteurs éventuels.

C'est en vue d'aborder cet aspect qu'ont été définies les conditions permettant d'obtenir un extrait cryodesséché stable. Des essais préliminaires de fractionnement par gel-filtration ont pu être réalisés à partir de cet extrait. D'autre part, il a été possible de localiser une partie importante de l'activité RNA-asique au niveau du germe du caryopse.

2-2- Acidité "grasse" et contamination fongique.

Dans cette étude, les expériences effectuées n'avaient pas pour objet de préciser la nature des divers acides libérés, mais de suivre l'évolution de l'acidité globale mesurée selon des conditions expérimentales données.

Pour les températures étudiées, nous avons observé qu'aux moyennes H.R. (de l'ordre de 50 à 70 %) pour lesquelles il n'y a pas de développement de la microflore, l'acidité "grasse" extractible ne varie guère. L'action de la lipase du blé est donc, dans ces conditions, négligeable, ce qui peut s'expliquer en partie par le rôle de facteur limitant que joue la structure cellulaire pour les contacts enzyme-substrat.

Par contre, aux H.R. supérieures et aux températures de 25 et 30°C, une corrélation a été établie entre la quantité de moisissures présentes et l'acidité "grasse" extractible, ce qui indique l'action prépondérante des lipases d'origine microbienne dans ces conditions de stockage.

2-3- Temps moyen de germination : Tm, et Capacité germinative : C.g.

Lors de stockages effectués dans des conditions favorables à la conservation (température et hydratation du grain peu élevées), la C.g. du grain, ainsi que le rapport Tm/Tm_t demeurent constants.

Si les conditions de stockage sont moins favorables (température de 30°C et H.R. de 60-70 % par exemple), dans une première phase, la C.g. du grain n'est pas altérée, et le rapport Tm/Tm_t reste égal à 1. Dans une deuxième phase, seul le rapport des Tm s'accroît linéairement par rapport à la durée de stockage. Dans une troisième phase, la C.g. diminue rapidement et devient nulle. Si le grain est stocké dans des conditions de température et surtout d'hydratation plus élevées, la C.g.,qui s'annule rapidement, suffit à renseigner sur le degré d'altération.

Il s'avère donc que la sensibilité de la mesure du Tm en fait une méthode de choix pour mettre en évidence les premières modifications de l'état biologique du grain.

Par ailleurs, nous avons confirmé et précisé la corrélation existante entre la diminution de la C.g. et l'accroissement d'acidité "grasse". Compte tenu de celle que nous avons établie entre la quantité de moisissures et l'acidité "grasse", nous pouvons dire qu'il existe une liaison entre la diminution de la C.g. et l'accroissement du nombre de moisissures. Cette liaison est vraisemblablement plus causale que celle établie entre C.g. et acidité "grasse".

2-4- Caractéristiques technologiques de la farine obtenue à partir du blé stocké.

L'alvéographe Chopin permet d'apprécier la force boulangère tandis que la panification nous donne un aperçu de la valeur boulangère de la farine obtenue à partir du blé stocké.

Nous avons confirmé et précisé le fait que l'altération des qualités plastiques des pâtes et des qualités organoleptiques des pains est presque toujours précédée d'une phase d'amélioration ; cette phase est d'autant plus courte que le blé est stocké dans des conditions de température et d'humidité plus élevées. Cependant, le W Chopin croît de façon plus significative que le volume du pain, pour diminuer ensuite rapidement, alors que celui-ci reste pratiquement constant. L'alvéographe Chopin apparaît donc pouvoir constituer un test plus sensible que celui de panification pour déceler l'altération de la farine.

Par contre, l'essai de panification reste irremplaçable dans la mesure où il intègre l'ensemble des phénomènes qui conditionnent l'acceptabilité du produit fini.

Du fait de la multiplicité des facteurs intervenant sur ces caractéristiques technologiques, il n'a pas été possible, au cours de cette étude, d'établir de liaison entre les résultats fournis par ces deux tests et les mesures obtenues par les autres déterminations effectuées.

3- PERSPECTIVES.

L'étude que nous avons effectuée est partielle car on est encore loin de dominer le problème de la conservation ; cependant, les techniques et méthodologies mises au point et utilisées constituent des éléments indispensables pour développer les recherches sur l'évolution biochimique et physiologique des organes végétaux, tels que le grain de blé en cours de stockage. Certains des tests étudiés sont particulièrement sensibles pour déceler un début d'altération, et peuvent servir pour caractériser l'aptitude du blé à certaines utilisations.

Cette recherche a montré combien les enzymes nucléolytiques des plantes,et plus particulièrement les ribonucléases, sont peu connues par rapport à la RNA-ase pancréatique. La purification des RNA-ases, leur structure, leur action catalytique, leur rôle sont encore mal élucidés. Les résultats fournis par les travaux antérieurs sont très difficilement comparables. En effet, les conditions de dosage : extraction, pH, température, durée, concentration en enzyme et substrat, sont extrêmement variables. De plus, des données importantes,comme la teneur en eau des plantes étudiées et les techniques de broyage, sont rarement précisées.

Par ailleurs, il convient de garder présent à l'esprit que le plus souvent les dosages ne peuvent, en toute rigueur, exprimer qu'une activité de dépolymérisation ; en effet, dans la majorité des cas, les enzymes ne sont qu'imparfaitement purifiées.

La connaissance précise de ces différents points nécessite une étude plus fondamentale, en cours actuellement, portant sur l'isolement des RNA-ases et de leurs effecteurs éventuels, puis sur la détermination de leurs propriétés physico-chimiques, et l'examen de leur comportement en milieu modèle.

PUBLICATIONS

Au moment de l'impression, cette étude a fait l'objet des publications suivantes :

- Development of some physiological and biochemical characteristics of wheat grain during storage under controled conditions (en collaboration avec J.L. MULTON et A. GUILBOT).
  - conférence : 2nd Internat. Biodeterioration Symp. Lunteren (Hollande), 13-18 septembre 1971.
  - publication : Biodeterioration of materials, 1972, 2, Edited by WALTERS A.H. and HUECK-VAN-DER PLAS E.H. (Applied Sc. Publishers LTD London), pages 499-506.
- Technique de détermination du temps moyen de germination ; application à la détection des grains de blé altérés au cours de chocs thermiques et de stockages expérimentaux (en collaboration avec J.L. MULTON et A. GUILBOT). Seed science Technology - 1972 - N° spécial sur le séchage et la conservation des semences (sous presse).
- Measurement of mean germination time and its relation to alterations in seeds (en collaboration avec J.L. MULTON et A. GUILBOT). 19th Easter School in Agricultural Science. Univ. of Nottingham School of Agriculture - 17-20 april 1972.

Cette méthode a, en outre, contribué à la réalisation de l'exposé et des publications suivantes :

- Méthode rapide de détermination des isothermes de sorption de l'eau par les solides et les liquides (en collaboration avec J.L. MULTON et A. GUILBOT).
  - conférence : Journées d'étude sur la mesure industrielle de l'humidité dans les solides et les liquides. AFCET, Paris, 1970.
  - publications : - Mesure, régulation, automatisme, 1971, 36, (7),56-62.
    - Lebensium. Wiss. u. Technol., 1971, 4, (6), 184-189.

ANNEXE

LES RIBONUCLEASES VEGETALES

Dans l'exposé des travaux antérieurs, nous nous sommes limités au dépouillement des résultats qui concernent plus particulièrement nos travaux. C'est ainsi que nous avons étudié les principales caractéristiques des RNA-ases issues de céréales et l'évolution de l'activité RNA-asique au cours de la formation du grain.

Dans cette annexe, nous nous proposons, en premier lieu, de compléter l'étude des RNA-ases d'origine végétale en faisant part des résultats déjà obtenus, et qui concernent les RNA-ases mises en évidence dans des végétaux autres que les céréales.

Il nous est apparu fondamental, en second lieu, d'aborder les effets de traumatismes, et en particulier du vieillissement et de la sénescence, sur l'activité RNA-asique des tissus végétaux. On peut en effet considérer que le stockage et la conservation des grains, surtout s'ils se déroulent dans de mauvaises conditions, provoquent à plus ou moins long terme une altération, donc un traumatisme du matériel biologique.

A la lumière de ces constatations, il apparaît utile, en troisième lieu, de suivre l'évolution de l'activité RNA-asique lors de la germination.

I - PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES RNA-ases VEGETALES AUTRES QUE CELLES ISSUES DE CEREALES.

Rappelons tout d'abord (cf. travaux antérieurs) que nous avions caractérisé la présence de deux RNA-ases représentées RNA-ase* et RNA-ase**. Ces deux enzymes se différencient essentiellement par leur pH optimum d'activité, leur PM et surtout par le fait que, d'une manière générale, les activateurs de l'une sont les inhibiteurs de l'autre et inversement.

Les observations rapportées dans le tableau A confirment ces résultats. Nous compléterons ces informations en citant l'étude approfondie rapportée par WALTERS et al. (1966 a et b). Ces auteurs notent en effet que l'action de la RNA-ase** nécessite la présence d'ions métalliques et en particulier de Zn^{2+}. En l'absence d'ions Zn^{2+}, l'hydrolyse de pN

TABLEAU A - Propriétés principales des enzymes nucléolytiques végétales autres que celles issues de céréales.

Références	Origine	Enzyme - PM pH optimum	Effecteurs chimiques		Spécificité d'action sur un substrat ARN et principales caractéristiques
			activateurs	inhibiteurs	
STOCKX et al., 1961 a-b SUNG et al., 1962 WALTERS et al., 1966 a-b LORING et al., 1966 ISHII et al., 1967 JOHNSON et LASKOWSKI, 1970 MIKULSKI et al., 1970 ARDELT et LASKOWSKI, 1971 JOHNSON, 1971	LEGUMINEUSES germes de haricot	-RNA-ase M_1^* 5,5	non activateur EDTA 10^{-2} M.		produit des poly(N > p) puis des poly (Rp) uniquement
		-RNA-ase M_2^{**} 5,0 sans Zn^{2+} 4,5 avec Zn^{2+}		EDTA 10^{2}M	-produit pN et surtout 5'AMP en présence de Zn^{2+} -produit pN et surtout 5'CMP en l'absence de Zn^{2+}
		-3' nucléotidase		EDTA 10^{-2}M	produit dans l'ordre 3'AMP > 3'GMP > 3'UMP > 3'CMP. Selon d'autres auteurs, on aurait : A > T(U) > C > G
		-phosphomonoestérase -DNA-ase			
MATSUSHITA et IBUKI, 1960 b	germe de pois — cytoplasme	-RNA-ase* 5,6	non activée par EDTA $2,5.10^{-3}$M		enzymes très identiques aux RNA-ases mises en évidence par ces mêmes auteurs dans le blé.
	germe de pois — microsomes	-RNA-ase** 6,0		EDTA $2,5.10^{-3}$M	

LIN et YARNER, 1970	germes de pois	3'nucléotidase II (500.000?)5,4/6			-produit 3'NMP (5'NMP) à partir de 2', 3'NMP (3', 5' NMP)
		3'nucléotidase			-produit N à partir de 3' NMP et 5' NMP
MEROLA et DAVIS, 1962	germes de soja	-RNA-ase* 5,2		Cu^{2+} et Zn^{2+} 10^{-3}M	produit des poly (N > p) puis 3'AMP uniquement
ACTON et al.,1970 YECHER et al., 1971	germes de lupin (polysomes et ribosomes)	-RNa-ase* et ** (mélange) 25.000-6,3		actinomycine D 0,4 M CAP - 7.10^{-3}M	produit essentiellement des 2',3' AMP
REDDI 1958 a-b, 1959 BAGI et FARKAS, 1966-67	VEGETAUX DIVERS feuilles de tabac	-RNA-ase* 5,1		Cu^{2+}, Zn^{2+} 3.10^{-3}M	produit des poly (N > p) puis Rp uniquement
		-RNA-ase** (?) 32.000 - 6,8			
SHUSTER et al., 1953-57-59	germes de ray-grass	-RNA-ase* 4,5		KCN et cystéine 10^{-3}M	produit des poly (N > p) puis Np
		-Désoxy-RNA-ase 5,0 - 5,5			
		-3'nucléotidase 7,5			
TUVE et ANFINSEN, 1960	feuilles d'épinard	-RNA-ase* 5,6			produit des poly (N > p), poly (G > p) étant les premiers libérés, puis des Np
KADO, 1968	germes étiolés de concombre	-RNA-ase* 12.000 - 5,6			produit des Np avec libération préférentielle de Up

TANG et MARETZI, 1970	jeunes feuilles de canne à sucre	phosphotransférase 5,0	non activée par EDTA	Cu^{2+}, Zn^{2+} si $c > 10^{-5}$ M	produit des poly (N > p) avec libération de poly (R > p), puis libère N (peu)
SINGH et KRISHNAN, 1971 a-b	chloroplastes (stroma) de filaments de cuscute	-RNA-ase* 5-7	EDTA 10^{-2} M	Ca^{2+}, Zn^{2+} Mg^{2+} $.10^{-2}$ M	le pH optimum d'activité de ces enzymes est différent selon la variété de cuscute
		-DNA-ase 5,5 - 6,5	Cu^{2+}, Mg^{2+} 10^{-2} M	EDTA 10^{-2} M	
MARCHOUX, 1968 a-b, 1969, 1970	feuilles de piment	CR-Nase* 8,1			emploi de l'immuno-électrophorèse pour caractériser cette enzyme
NOMURA et al., 1970	tubercules de pomme de terre	3'nucléotidase 33.000 - 8	Ca^{2+}, Mg^{2+}, EDTA 10^{-3} et 10^{-4} M	Ca^{2+}, Zn^{2+} 10^{-3} et 10^{-4} M	-produit poly N et libère la base à partir de 3'AMP surtout -l'enzyme est contaminée avec une nucléase

s'effectue beaucoup plus lentement, et il y aurait libération préférentielle de 5'CMP (plutôt que de 5'AMP) en présence de ZN^{2+}. Ainsi s'explique vraisemblablement le fait que, pour cette enzyme, l'EDTA ait plutôt une action inhibitrice.

Toutes les autres enzymes nucléolytiques connues (3' et 5' nucléotidases, phosphomonoestérases non spécifiques et phosphodiestérases) existent chez les végétaux. On peut dire cependant qu'aucune ne semble avoir été purifiée et caractérisée d'une manière satisfaisante ; leur présence en faible quantité et leur PM élevé rendent d'ailleurs malaisée leur étude.

II - EFFET D'UN TRAUMATISME SUR L'ACTIVITE RNA-asique DES TISSUS VEGETAUX.

Il apparaît que l'activité RNA-asique d'un tissu végétal varie lorsque la plante subit un traumatisme dont la nature peut être très variée. Le tableau B résume les différentes observations qui mettent ce phénomène en évidence.

Le fait essentiel est que, dans tous les cas, on observe un accroissement de l'activité RNA-asique ; pour la plupart des auteurs, celui-ci est dû à une synthèse de l'enzyme et non à l'action d'effecteurs chimiques, ainsi que le confirme le blocage de la synthèse en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique tels que la cycloheximidine ou l'actinomycine D.

Il semble, par ailleurs, que la lumière ait un effet spécifique favorisant la synthèse de la RNA-ase* d'origine cytoplasmique, cependant que, à l'obscurité, c'est l'activité de la RNA-ase** qui augmente.

Parallèlement à la synthèse de RNA-ase, on observe :

- une diminution de la quantité d'ARN qui affecte l'ARN_s, l'ARN_r et l'ARN_m ; l'ARN_t ne variant pas significativement;
- une diminution de la quantité de protéine, de l'intensité respiratoire des cellules, de la quantité de chlorophylle, de la croissance (donc du nombre de mitoses), des activités auxinique et giberellique ; l'AIA et le GA_3 se comportant en antagonistes de l'activité RNA-asique.

TABLEAU B - Effet produit par un traumatisme sur l'activité RNA-asique des plantes.

Référence	Origine	Nature du traumatisme ou du traitement	Effet observé sur l'activité RNA-asique, influence des effecteurs
	CEREALES		
ATKIN et SRIVASTAVA 1968-1969 SRIVASTAVA, 1968 a-b	feuilles d'orge âgées de 7 j	feuilles coupées et placées dans de l'eau	accroissement considérable particulièrement mis en évidence dans la chromatine, et inhibé par la kinétine (10mg/l).
CHRISPEELS et VARNER, 1967	aleurones d'orge	application de 5m MμGA$_3$	- accroissement pendant 24 h, puis décroissance - accroissement inhibé par cycloheximidine ou actinomycine D
LONTAI et al., 1970	orge	2,4-D en pré et post émergence	accroissement considérable d'autant plus marqué que le 2,4-D est appliqué en pré-émergence
LESHEM, 1971	endosperme d'orge	ABA 2 mg/l	accroissement inhibé par GA$_3$ (1mg/l)
LÁZÁR et FARKAS, 1970	feuilles d'orge et de tabac	excision	accroissement d'activité
CHERRY, 1962	extrémité de coléorhize de maïs	- racines excisées - rayons X (250 KR)	accroissement corrélativement à une diminution d'ARN et de protéines
HSIAO et al., 1968 HSIAO, 1968	germes de maïs âgés de 10 j	carence en K^+	accroissement, le rapport activité RNA-asique sur ARN double ou triple en cas de carence en K^+

HANSON et al.,1965	maïs { germes feuilles	selon âge sénescentes	en relation inverse avec l'intensité respiratoire encore élevée, même lorsque les feuilles sont desséchées
TRUELSEN, 1967	coléoptile de blé et de pois	AIA 10^{-5}M	décroissance, corrélativement à une augmentation d'ARN, pouvant être inhibée par le p-chloromercuribenzoate 5.10^{-4}M
HADZIJEV et al., 1969	racines et feuilles de blé	-excision -application de carborundum	accroissement inhibé par bentonite (0,2 à 4 mg/ml) ou par p-chloromercuribenzoate (0,1 à 3,4 mM)
SODEK et WRIGHT, 1969	feuilles de blé	-excision et sénescenoe	- accroissement des deux RNA-ases WL I et WL II mises en évidence. La kinétine (10^{-4}M) et la zéatine (10^{-5}M) inhibent l'accroissement d'activité de la seule RNA-ase WL I
		-illumination	- accroissement de la RNA-ase II (essentiellement) inhibé par la kinétine (10^{-4}M) et le CAP (1 mg/ml)
LADO et al., 1968	feuilles d'avoine	excision puis sénescence	deux accroissements qui se produisent successivement après chaque traumatisme
UDVARDY et al., 1966, 1967 WYEN et al., 1969, 1971 a et b WYEN et FARKAS, 1971	feuilles d'avoine	excision et sénescence	accroissement, qui est particulièrement sensible pour la RNA-ase d'origine cytoplasmique, lorsqu'il y a éclairement. Une corrélation inverse entre la quantité d'ARN et l'activité RNA-asique est mise en évidence
	LEGUMINEUSES		
SACHER, 1969 DE LEO et SACHER, 1970-1971	endocarpe de haricot	sénescence ABA (10^{-5}M)	- accroissement inhibé par AIA (10 g/ml) - accroissement en corrélation avec une diminution d'ARN

PHILIPS et FLETCHER, 1969 PHILIPS et al.,1969	feuilles de haricot	sénescence	diminution de la quantité d'ARN due à un accroissement d'activité RNA-asique malgré une diminution supposée de la quantité de RNA-ase
NENE et THORNBERRY, 1970	feuilles de fève	virus de la mosaïque du tabac (TMV)	l'application de RNA-ase empêche l'infection virale. Ce fait s'expliquerait par un phénomène physique
SAMULKA, 1971	racines et feuilles de fève	sénescence	accroissement qui est peut-être dû à la synthèse d'une seconde RNA-ase
PILET, 1969 a et b, 1970 PILET et al., 1970 a et b	épicotyles et racines de lentille	AIA 10^{-5} M NaF 0,05 M	- l'apport de RNA-ase (40 unités/mg) diminue la croissance stimulée par l'AIA - accroissement considérable
ACTON et al., 1971	hypocotyle de lupin	excision	accroissement plus marqué si le végétal est éclairé. Cet accroissement serait dû à une synthèse d'enzyme localisée dans les fractions ribosomales et le polysome
	VEGETAUX DIVERS		
YASH PAL, 1966	feuilles de tournesol	carence en bore	accroissement
REDDI, 1959 BAGI et FARKAS, 1966-1967	feuilles de tabac	sénescence	- accroissement
		virus mosaïque du tabac	- accroissement dû à une synthèse de RNA-ase
		2,4 - D	- accroissement dû à une synthèse de RNA-ase
DOVE, 1967 MAC HALE et DOVE, 1968	feuilles de tomate	sénescence	accroissement inhibé par l'actinomycine D (5.10^{-5}M), mais activé par le 2,4-D (10^{-4}M). Cet accroissement est en relation inverse avec la quantité de chlorophylle.

DE LEO et SACHER, 1970	feuilles de nénuphar	- sénescence) - ABA)	- accroissement inhibé par AIA
MARCHOUX, 1968 a et b - 1969, 1970	feuilles de piment	virus du piment	la RNA-ase inhibe l'infection virale
MILLIKAN et GOSH, 1971	plantules et feuilles de lierre	sénescence	diminution de la quantité d'ARN_s, ARN_r et ARN total
PITT et GALPIN, 1971 PITT, 1971	tubercule et feuilles de pomme de terre	excision	accroissement faiblement inhibé par l'actinomycine D (30 µg/ml), fortement inhibé par cycloheximidine (50 µg/ml). Il est possible que cet accroissement soit dû à l'activation d'un précurseur de la RNA-ase.

III - EVOLUTION DE L'ACTIVITE RNA-asique LORS DE LA GERMINATION.

Nous avons analysé, dans les travaux antérieurs, les études portant sur les fluctuations d'activité RNA-asique lors de la fructification. Cependant, la période de la vie du végétal la plus étudiée est la germination. L'activité a été examinée dans les différentes parties anatomiques de la plantule : gemmule et radicule, de l'albumen et du scutellum, et à différents stades de son développement ; en particulier, dans ce dernier cas, au sein de différentes parties cytologiques : microsomes, reticulum endoplasmique et ribosomes, cytoplasme, chromatine.

Si les travaux ayant trait à l'activité RNA-asique lors de la germination sont nombreux, les résultats sont difficilement comparables. En effet, les conditions de germination sont différentes, l'activité RNA-asique dosée est plus ou moins spécifique et les méthodes de dosage sont très variables. Malgré cela, on peut dégager les observations suivantes.

Dans l'embryon de blé, tout d'abord, l'activité RNA-asique décroît pendant les 10 à 15 premières heures de la germination, puis elle augmente d'une manière considérable jusqu'à la 40e heure de germination (VOLD et SYPHERD, 1968).

Lorsque la germination a lieu à l'obscurité, entre 20 et 30°C, il apparaît que l'activité RNA-asique totale du grain croît considérablement après les premières heures de germination, pendant 4 à 6 jours, puis décroît jusqu'au 15e jour de germination. En outre, de nombreux auteurs constatent que l'activité RNA-asique du germe, des parties de la plantule et du scutellum croît d'une manière continue, alors que celle des cotylédons ou de l'albumen passe par un maximum (SEMENENKO, 1955, sur pois et blé ; MATSUSHITA, 1959 a, sur blé ; BARKER et DOUGLAS, 1960, sur pois ; INGLE, 1963, sur maïs ; HANSON et al., 1965, sur maïs ; ISHII et al.,1967, sur fève ; KAWATA et al., 1969, sur blé, fève, millet et radis ; PAUL et al., 1970, sur fève ; MARKOWSKI et PISKORNIK, 1970, sur blé ; ACTON et al., 1970, sur lupin ; BARKER et al., 1971, sur pois).

Seuls, SISSAKIANE et al. (1957) dans le cas de l'orge, et CHERRY (1963) dans le cas de l'arachide, ne confirment pas ces résultats.

A température moins élevée, les faits observés sont identiques bien que moins importants (MARKOWSKI et PISKORNIK, 1970). Enfin, selon MATSUSHITA (1959 a), les phénomènes sont les mêmes à la lumière.

HANSON et al. (1965) considèrent que, lors de la germination, l'activité d'une RNA-ase d'origine cytoplasmique augmente considérablement, tandis que l'activité d'une seconde RNA-ase resterait sensiblement stable. Ce fait est infirmé par ISHII et al., 1967, qui mettent en évidence une évolution identique des activités RNA-asiques, phosphomonoestérasique et phosphodiestérasique lors de la germination.

Enfin, selon PILET et BRAUN (1970), l'activité RNA-asique est 10 fois plus importante à l'extrémité des racines (de 0 à 0,2 mm) que dans la zone méristématique (de 0,2 à 0,7 mm) et jusqu'à une distance approximative de 7 mm à partir de l'extrémité de la racine. Par contre, de 8-9mm à 18 mm, l'activité croît considérablement. Selon GROSS et al. (1970), l'activité RNA-asique est nettement plus importante dans les cellules épithéliales que dans le cortex.

IV- CONCLUSION.

Outre les conclusions déjà rapportées lors des travaux antérieurs, il se dégage de cette étude bibliographique les éléments suivants :

- la purification, la caractérisation et la localisation de ces enzymes se révèlent être des opérations complexes qui obligent les chercheurs à employer des moyens de plus en plus élaborés, afin de résoudre ces problèmes ;
- l'étude de ces enzymes est compliquée du fait de la présence certaine de précurseurs aux caractéristiques voisines, ainsi que de la présence d'inhibiteurs protéiques ;
- malgré ces difficultés, deux RNA-ases aux caractéristiques assez voisines ont été relativement bien purifiées ;
- l'activité RNA-asique de ces RNA-ases est en relation inverse avec "l'activité" du végétal ; selon toute probabilité, lorsqu'il y a accroissement d'activité, il y a synthèse de RNA-ase, quoique certains auteurs attribuent cet accroissement à l'activité d'effecteurs (en particulier la disparition d'inhibiteurs ou de l'activité de ces inhibiteurs) ;
- l'activité RNA-asique croît d'une manière considérable lorsqu'il y a traumatisme ou sénéscence du tissu végétal, sans que l'on sache si cet accroissement est une cause ou une conséquence.

En résumé, il nous apparaît qu'une étude approfondie des RNA-ases portant sur l'isolement des enzymes, et surtout de leurs effecteurs, puis sur la détermination de leurs propriétés physicochimiques, est d'un intérêt fondamental.

Dans une optique qui nous intéresse plus particulièrement : la conservation, l'étude de la RNA-ase est susceptible de nous éclairer sur certains aspects mal connus des mécanismes de l'altération.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(exclues les références concernant la ribonucléase)

ABBOTT D.L. (1955) - Temperature and the dormancy of apple seeds. XIVth Intern. Horti. Cong. (La Haye - Scheveningen) I, (2A) - 746-753.

ACKER L., BEUTLER H.O. (1963) - Die enzymatische Phytinspaltung in geschrotetem Getreide in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit. Z.f. Brnährungswissenchaft, 3, 1-5.

ACKER L., BEUTLER H.O. (1965) - Über die Tätigkeit der Lipasen in Getreidemahlprodukten in Abhäugigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit. Getreide und Mehl., 16, 1, 4-6.

ANDERSON J.A. (1954) - Storage of cereal grains and their products - American Association of Cereal Chemists - St Paul - Minnesota.

ANDERSON J.D., BAKER J.E., WORTHINGTON E.K. (1970) - Ultrastructure changes of embryos in wheat infected with storage fungi. Plant. Physiol., 46, 857-859.

BADONNEL A. (1943) - Les psocoptères - Faune de France, 42, 135-139 (P. Chevallier, Paris).

BARTON L.V. (1961) - Seed preservation and longevity. London Leonard Hill (books) limited. Interscience publishers, Inc. New-York.

BELLENGER P. (1971) - Etude de quelques phénomènes physiologiques et physicochimiques au cours du stockage des grains et des farines de blé. D.E.A. de Physiologie Végétale Appliquée. Fac. Sc. Paris.

BOCKHOLT A.J., ROGERS J.S., RICHMOND T.R. (1969) - Effets of various storage conditions on longevity of cotton, corn and sorghum seeds. Crop Sc. 9, 151-153.

BOOTH R.G. (1948) - Some characteristics of the nuclear enzymes of wheat. In "Le Pain" - Journées scientifiques du C.N.R.S., 137-142.

BOTTOMLEY R.A., CHRISTENSEN C.M., GEDDES W.F. (1950) - The influence of various temperatures, humidities, and oxygen concentrations on mold growth and biochemical changes in stored yellow corn. Cereal Chemistry, 27, 271-296.

BOURDET A., LECLERCQ J.R. (1970) - Sur les critères d'appréciation de la qualité boulangère des blés au niveau européen. Tech. Indus. Céréalières, (129), 11-20.

BRABENDER (1964) - La mouture d'essai. Tech. Meunière (95), 18-21.

BURE J. (1961) - La valeur boulangère du point de vue français. I.A.A. (3), 255-270.

BURGES H.O., BURREL N.J. (1964) - Cooling bulk grain in the British climate to control storage insects and improve keeping quality. J. Sci. Fd. Agric., 15, (1), 32-50.

BUTTIAUX R. (1968) - Cours du C.E.R.D.A. - Lille.

CAGNAC J. (1964) - Etudes sur le moulin Brabender senior. Tech. Meunière (95), 13-17.

CAHAGNIER B. (1971) - La microflore du maïs grain humide. Composition et évolution en fonction de différents modes de stockage. Action de traitements stabilisants. Mémoire D.P.E. du C.N.A.M.

CAILLAT J.M. (1970) - Contribution à l'étude de la lipase du blé : isolement, caractéristiques de son action en milieux aqueux et peu hydraté. Thèse de Docteur-Ingénieur. Fac. Sciences de Paris - n° du C.N.R.S. A.O. 4061.

CASSAGNE H. (1961) - Milieux de culture. Collection technique de base. Edit. La Tourelle - Saint Mandé.

CHOPIN M. (1921) - Relations entre les propriétés mécaniques des pâtes de farine et la panification. Bull. Soc. Encouragement Indus. Nat., 133, 261-273.

CHOPIN M. (1968) - L'alvéographe système M. CHOPIN - 92 BOULOGNE.

CHRISTENSEN C.M. (1951) - Fungi on and in wheat seed. Cereal Chemistry, 28, 408-415.

CHRISTENSEN C.M. (1955) - Grain storage studies : mold invasion of wheat stored for sixteen months at moisture contents below 15 per cent. Cereal Chemistry, 32, 107-116.

CHRISTENSEN C.M., HODSON A.C. (1960) - Development of granary,weevils and storage fungi in columns of wheat. J. of Eco. Entomo. 53, 375-380.

CHRISTENSEN C.M., KAUFMANN H.H. (1965) - Deterioration of stored grains by fungi. Annual Rev. Phytopath. - 69-84.

CHRISTENSEN C.M., KAUFMANN H.H. (1969) - Grain storage. The role of fungi in quality loss. Edited by Univ. of Minn. Press. Minneapolis.

CHRZANOWSKA H. (1967) - Microflore du seigle et de la farine de seigle. I.A.A., 1, 17-24.

C.N.E.E.M.A. (1968) - Expérience "blé longue durée numéro 2 - 1966-1968".

C.N.E.R.N.A. (1968) - Les méthodes analytiques des céréales, 214.

CÔME D. (1967) - L'inhibition de germination des graines de pommier non dormantes. Rôle possible des phénols tégumentaires. Ann. Sci. Nat. Bot., 8, 371-478.

CÔME D. (1968) - Problèmes de terminologie posés par la germination et ses obstacles. Bull. Soc. Franç. Physiol. Végét., 14, (1), 3-9.

CÔME D. (1970) - Les obstacles à la germination. Ed. MASSON. Monographie de Physiologie Végétale.

CORTE DOS SANTOS A., CAHAGNIER B., DRAPRON R., GUILBOT A., HAHN J., LEFEBVRE J., MULTON J.L., POISSON J., TRENTESAUX E. (1971) - Etude de l'évolution de plusieurs caractéristiques d'un café arabica au cours d'un stockage expérimental effectué à cinq humidités relatives différentes. Ve Colloque Inter. Chimie des cafés verts et de leurs dérivés. Lisbonne, 14-19 juin (in Café, Cacao, Thé, 15, (4), 329-340).

GUENDET L.S., LARSON E., NORRIS C.G., GEDDES W.F. (1954) - The influence of moisture content and other factors on the stability of wheat flours at 37.8°C. Cereal Chem., 31, 362-389.

DAFTARY R.D., POMERANZ Y., SAUER D.B. (1970 a) - Changes in wheat flour damaged by mold during storage. Effects on lipid, lipoprotein and protein. J. Agri. and Food Chem., 18, (4), 613-616.

DAFTARY R.D., POMERANZ Y., COOKS R.G., WOLFE N.L. (1970 b) - Fluorescent metabolites in mold-damaged wheat flour. Experienta, 26, (10), 1056-1057.

DRAPRON R., GUILBOT A. (1962) - Contribution à l'étude des réactions enzymatiques dans les milieux biologiques peu hydratés. La dégradation de l'amidon par les amylases en fonction de l'activité de l'eau et de la température. Ann. Technol. Agric., 11, (3), 175-218 ; 11, (4), 275-317.

DRAPRON R., UZZAN A. (1968) - Problèmes concernant l'activité lipolytique et lipoxygénasique des grains, graines et fruits oléagineux. Ann. Nutri. Alim., 22, B 393-B 436.

GAC A. (1955) - Contribution à l'étude de l'influence de l'humidité relative et de la vitesse de circulation de l'air sur le comportement des fruits cueillis. Thèse Ingénieur-Docteur - Paris.

GLASS R.L., PONTE J.G.Jr, CHRISTENSEN C.M., GEDDES W.F. (1959) - The influence of temperature and moisture level on the behavior of wheat stored in air or nitrogen. Cereal Chemistry, 36, 341-356.

GORDON A.G. (1971) - The germination resistance test. A new test for measuring germination quality of cereals. Can. J. Plant. Sci., 51, 181-183.

GUILBOT A., LINDENBERG A.B. (1960) - Eau non solvante et eau de sorption de la cellule de levure. Biochim. et Biophys. Acta, 39, 389-397.

GUILBOT A. (1960) - L'acidité des blés, farines et autres produits dérivés. Technique Meunière, 75, 4-13.

GUILBOT A., POISSON J. (1963) - Conditions et durée de stockage et durée de conservation des grains. Journées d'études sur la conservation des grains (I.T.C.F., C.E.R.D.I.A., C.N.E.E.M.A.). Maison de la Chimie - Paris (14 mai).

GUILBOT A. (1967) - Activités enzymatiques en milieu peu hydraté. Ann. Nut. Alim., 21, B 87 - B 112.

GUILBOT A. (1968) - Le dosage rapide de l'eau dans les grains. Le Producteur Agri. Franç., 28 (supplément).

GUILBOT A. (1969) - Aspects généraux du problème de la qualité des blés. B.T.I., (244), 1-10.

HARRINGTON J.F. (1962) - The effect of temperature on the germination of several kinds of vegetable seeds. XVIth Intern. Horti. Cong. (Bruxelles), II, 435-441.

HUNTER J.H., TUITE J.L. (1967) - The growth of storage fungi and aflatoxin production in corn as related to moisture and temperature. Phytopatho., 57, (8), 816.

I.C.C. (1971) - An international comparative study on methods for acidity determination using normal flours and the same flours after heating and drying. Internat. Assoc. for Cereal Chemistry, study group 25. BLOKSMA A.H., BRUINSMA A.N.- report n° 71-414.

I.T.C.F. (1970) - Qualité des blés, méthodes d'analyse. Producteur Agri. Franç., (73), supplément édité par l'Institut Technique des Céréales et des Fourrages.

JAY E.G., ARBOGAST R.T., PEARMAN G.C., Jr (1971) - Relative humidity : its importance in the control of stored, product insects with modified atmospheric gas concentrations. J. stored Prod. Res., 6, 325-329.

JEMMALI M., POISSON J., GUILBOT A. (1969) - Production d'aflatoxines dans les produits céréaliers. Influence de différentes conditions. Ann. Nutr. Alim., 23, 151-166.

KENT-JONES D.W., AMOS A.J. (1967) - Modern cereal chemistry. Food Trade Press. L.T.D.- 6th Edition - 730 pages - LONDON.

KOTOWSKI F. (1926) - Temperature relations to germination of vegetable seeds. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 23, 176-184.

KREYGER J., SIJBRING P.H., SPARENBERG H. (1963) - Collected reprints on the drying and storage of seeds. Publikatie 117 - I.B.V.L.- Wageningen - The Netherlands.

LAGRANDEUR G., POISSON J. (1968) - La microflore du maïs, son évolution en fonction des conditions hydriques et thermiques de stockage en atmosphère renouvelée ; I.A.A., 6-7, 775-788.

LAGRANDEUR G., TOLLIER Th., GUILBOT A. (1968) - Evolution de certains constituants du grain de maïs en fonction de diverses conditions de stockage ou de séchage, I.A.A., (6-7-, 837-842.

LECOURBE P. (1960-1961-1962) - Résultats non publiés (Rapports de contrat de recherche C.E.A.).

LEPIGRE A. (1951) - Insectes du logis et du magasin. 46-48 (chez Carbonet-Alger).

LINDENBERG A.B., GARY-BOBO C. (1956) - Evolution de l'acidité grasse dans la farine de blé conservée en vase clos à 5° et 20°C, I.A.A., 9-10, 631-633.

LINKO P. (1960) - The biochemistry of grain storage. Cereal Science Today, 5, (10), 302-306.

LINKO P., SOGN L. (1960) - Relation of viability and storage deterioration to glutamic acid decarboxylase in wheat. Cereal Chem., 37, (4), 489-499.

LOISELEUR J. (1963) - Techniques de laboratoire. Masson éditeurs - 3e édit. Tome 1, fascicule 1.

LONCIN M. (1961) - Les opérations unitaires du génie chimique. Ed. Dunod, Paris.

MASSON C.G. (1959) - Détérioration des graines de colza. Publication du C.E.T.I.O.M.

MAUZE C. (1968) - Influence des dates de moisson sur l'évolution de la valeur boulangère au cours du temps. Communication présentée aux journées de Detmold.

MILNER M., CHRISTENSEN C.M., GEDDES F. (1947) - Grain storage studies : wheat respiration in relation to moisture content, mold growth, chemical deterioration and heating. Cereal Chemistry, 24, 182-199.

MIROCHA C.J., CHRISTENSEN C.M., NELSON G.H. (1968) - Toxic metabolites produced by fungi implicated in mycotoxicoses. Biotech. Bioeng., 10, 469-482.

MOREAU C. (1968) - Moisissures toxiques dans l'alimentation. Edité par Lechevalier - 372 pages.

MOREAU C. (1970) - Les moisissures des farines panifiables. Ann. Nutr. Alim., 24, 117-127.

MULTON J.L., GUILBOT A. (1967) - Méthode de détermination rapide des isothermes de sorption de vapeur d'eau. Ann. Technol. Agri., 16, (1), 5-25.

MULTON J.L., GUILBOT A. (1968 a) - La régulation de l'humidité relative dans les cellules de petit volume. I.A.A., 4, 405-414.

MULTON J.L., GUILBOT A. (1968 b) - Recherche de critères de début d'altération : incidence d'un choc thermique effectué sur le grain de blé à hydratation constante vis-à-vis de l'activité ribonucléasique extractible et du temps moyen de germination. I.A.A., (67), 795-801.

MULTON J.L., LECOURBE P., GUILBOT A. (1968) - Méthode d'appréciation de la détérioration biologique des grains par mesure du temps moyen de germination. 1st International Biodeterioration, Symposium (Southampton) in biodeterioration of materials, par WALTERS A.M. et ELDHICK J. (Elsavier, London).

MULTON J.L., POISSON J., GUILBOT A. (1969) - Les altérations du grain de blé après la récolte. B.T.I., (244), 853-870.

MULTON J.L. (1969 a) - Contribution à l'étude du rôle de l'eau dans les mécanismes de dénaturation thermique des protéines en milieu solide peu hydraté. Thèse de Doctorat d'Etat ès sciences appliquées, Fac. Sciences, Paris - N° au C.N.R.S. A.O. 38.00.

MULTON J.L. (1969 b) - L'activité ribonucléasique dans les céréales - Méthode de dosage - deuxième thèse de doctorat.

NEZGOVOROVA L.A., BORISOVA N.N. (1967) - The trigger mechanism of germination seeds - III Effect of diamines on germination seeds. Fizziol. Rast., 14, (4), 644-651.

NICOLET J. (1968) - Un problème d'actualité : les mycotoxines. Path. Microbiol.,32, 124-136.

PAPAVIZAZ G.C., CHRISTENSEN C.M. (1958) - Grain storage studies : fungus invasion and deterioration of wheat stored at low temperatures and moisture contents of 15 to 18 %. Cereal Chemistry, 35, 27-34.

PELHATE J. (1968) - Contribution à l'étude écologique des moisissures des blés de conservation. Thèse de Doctorat ès sciences naturelles. Fac. Sc. Brest - Univ. de Rennes - N° C-2-1.

PELSHENKE and al. (1964) - Standard-Methoden für Getreide, Mehl und Brot. S.55, 4. Auflage, Moritz Schäfer, Detmold, p. 55-57.

PERRET G., POMA J. (1963) - Résultats inédits.

PIXTON S.W., HYDE M.B., AYERST (1964) - Long-term storage of wheat. J. Sci. Fd. Agric., 15, (3), 152-161.

PIXTON S.W., HILL S.T. (1967) - Long-term storage of wheat II. J. Sci. Fd. Agric., 18, 94-98.

POCHON J., de BACJAC H. (1958) - Traité de microbiologie des sols. Edit. Dunod, Paris.

POISSON J., CAHAGNIER B. (1963) - Résultats non publiés.

POISSON J., GUILBOT A. (1963 a) - Conditions de stockage et durée de conservation des grains. Meunerie Française. (163), 1-9.

POISSON J., GUILBOT A. (1963 b) - Résultats inédits.

POISSON J., BEGUE D., BOURDON G. (1967) - Conservation de la qualité des farines. Meunerie Française, (127), 21-34.

POMA J., LAUNAY B. (1967) - Essai de cuisson standardisé (non publié). E.N.S.I.A. au C.E.R.D.I.A. - 91. Massy.

POMERANZ Y. (1971) - Review of recent studies on biochemical and functional changes in mold damaged wheat and flour. Cereal Sc. Today, 16, (4), 119-122.

ROBERTS E.H. (1960) - The viability of cereal seed in relation to temperature and moisture. Ann. Bot., 93, 12-31.

ROBERTS E.H., ABDALLA F.H. (1968) - The influence of temperature moisture and oxygen on period of seed viability in barley, broad beans and peas. Ann. Bot., 32, 97-117.

SHOTWELL O.L., HESSELTINE C.W., GOULDEN M.L., WANDEGRAFT E.E. (1970) - Survey of corn for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin. Cereal Chem., 47, (6), 700- 707.

SIVORI E., NAKAYAMA F., CIGLIANO E. (1968) - Germination of Achira seed (Canna sp.) approximately 550 years old. Nature, 219 (5160), 1269-1270.

SORENSEN N. (1938) - Théorie, mesure et applications du pH. Dunod Ed.

SORGER-DOMENIGG M., GUENDET L.S., GEDDES W.F. (1955) - Grain storage studies XX. Relation between viability, fat acidity, germ damage, fluorescence value, and formazan value of commercial wheat samples. Cereal Chemistry, American association of cereal chemists, 6, (32), 499-506.

SPICHER G. Von (1958) - Ergebnisse zweijähriger Untersuchungen über die Mikroflora des Getreides. Die Müllerei, 50, 89-96.

SPICHER G. Von (1968) - Die Mikroflora des Getreides und ihre Wirkung auf die Qualität des Getreides und der Getreide Produkte. Landwirtshaftliche Forschung, 22 (n° spécial).

STAWICKI S., KAMINSKI E. (1965) - Effect of quantitative and qualitative infection of wheat flour on its stability biochemical and technological properties. Final technical report - chair of agriculture - Poznam.

THEVENOT C., CÔME D. (1971) - Influence de la température et du mode d'imbibition sur la germination des embryons de pommier (Pirus Malus L.) non dormants. C.R. Acad. Sc. Paris, D 273, 2515-2517.

TIMSON J. (1965) - New method of recording germination data. Nature, 207, (4993), 216-217.

TUITE J.F., CHRISTENSEN C.M. (1957 a) - Grain storage studies : time of invasion of wheat seed by various species of Aspergillus responsible for deterioration of stored grain, and source of inoculum of these fungi. Phytopatho. 47, 265-268.

TUITE J.F., CHRISTENSEN C.M. (1957 b) - Grain storage studies : moisture content of wheat seed in relation to invasion of the seed by species of the A. glaucus group, and effect to invasion upon germination of the seed. Phytopatho., 47, 323-327.

TUITE J.F. (1959) - Low incidence of storage molds in freshly harvested seed of soft red winter wheat. Plant disease reporter, 43, 470.

TRISVYATSKII L.A. (1969) - Storage of grain. Edited by KENT N.L. and FREEMAN J.A. (National Lending library for sciences and technology, Boston spa. England). Traduction of Russian book ; Khranenie zerna 1966 - Moscou.

VISSER (1956) - Some observations on respiration and secondary dormancy in apple seeds. Proc. kon. ned. Akad. Wet., C59, 314-324.

BIBLIOGRAPHIE SUR LA RIBONUCLEASE

ACTON G.J., LEWINGTON R.J., MYERS A. (1970) - The effect of light upon ribonuclease activity of etiolated Lupinus albus hypocotyls. Bioch. Biophys. Acta, 204, 144-155.

ARDELT W., LASKOWSKI Sr.M. (1971) - Mung bean nuclease I. IV An improved method of preparation. Bioch. Biophys. Res. Comm., 44 (5), 1205-1211.

ATKIN R.K., SRIVASTAVA B.I.S. (1968) - Changes in nucleic acid metabolism of excised barley leaves during senescence and the effects of kinetin on these changes. Physiol. Plant., 21 (6), 1234-1240.

ATKIN R.K., SRIVASTAVA B.I.S. (1969) - The changes in soluble proteins of excised barley leaves during senescence and Kinetin treatment. Physio. Plantarum, 22 (4), 742-750.

BAGI G., FARKAS G.L. (1966) - The response of ribonuclease level to cellular injury in tobacco leaf tissues. Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 1,(3), 329-331.

BAGI G., FARKAS G.L. (1967) - On the nature of increase in ribonuclease activity in mechanically damaged tobacco leaf tissues. Phytochemistry, 6, (2), 161-169.

BARKER G.R., DOUGLAS T. (1960) - Function of ribonuclease in germinating peas. Nature, 188, 943-944.

BARKER G.R., HOLLINSHEAD J.A. (1966) - Degradation of RNA by extracts of germinating peas. Nature, 212, (26), 926-927.

BARKER G.R., BRAY C.M., WALTER T.J. (1971) - Acid phosphatase and ribonuclease in the cotyledons of germinating peas. Biochem. J., 124, (2), 11 p.

BARNARD E.A. (1969) - Ribonucleases. Ann. Rev. Biochem., 38, 677-732.

BERGES J., URIEL J. (1971) - Mise en évidence des activités ribonucléasiques et déoxyribonucléasiques après électrophorèse en acrylamide-agarose. Biochimie, 53, (3), 303-306.

BOVE J.M., YOT P. (1965) - Contrôle des hydrolyses d'acides nucléiques par chromatographie sur couche mince. Bull. Soc. Chim. Biol., 47, (6), 1286-1288.

BROWN D.M., DECKER C.A., TODD A.R. (1952) - Nucleotides. Part XIII. The action of ribonuclease on the 2':3'-phosphates of uridine and cytidine. (512), 2715-2721.

BROWN D.M., TODD A.R. (1953) - Nucleotides; Part XXI. The action of ribonuclease on simple esters of the monoribonucleotides. J. Chem. Sol. (416), 2040-2049.

BURGESS R.R., (1971) - RNA Polymerase. Ann. Rev. Biochem., 40, 711-740

BURI J.F., (1971) - Démonstration de la présence d'un inhibiteur naturel de la ribonucléase dans le foie de boeuf. Electrofocalisation ionique de de facteur. C.R. Acad. Sci., D 272, 651-654.

CATTAN D., LACOMBE C., LAIGLE A., (1971) - Changements de conformation dans les complexes DNA. - Ribonucléase. C.R. Acad. Sci., D 272, 1556 - 1599.

CHERRY J.H., (1962) - Ribonucleic acid metabolisme during growth of excised root tips from normal and X-irradiated corn seeds. Biochim. Biophys. Acta, 55, 487-494.

CHERRY J.H., (1963) - Nucleic acid, mitochondria, and enzyme change in cotyledons of peanut seeds during germination. Plant Physiol., 38, (4), 440 -446.

CHRISPEELS M.J., VARNER J.E.,(1967) - Gibberellic acid enhanced synthesis and release of amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. Plant. Physiol., 42, (3), 398-406.

CHUNG H, MANDELES S., (1964) - Modification in the preparation and essay of T_1 ribonuclease. Biochim. Biphys. Acta, 92, (2), 403-405.

COMITE CONSULTATIF DU LANGAGE SCIENTIFIQUE, (1970) - Décision of l'Académie des Sciences relatives au langage scientifique. C.R. Acad. Sci.D 270, 138-144.

CRESTFIELD A.M., SMITH K.C., ALLEN F.W., (1955) - The preparation and characterization of ribonucleic acids from yeast. The J. of Biol. Chem. 216, (1) , 185 - 193.

DALBY A., DAVIES I. I., (1967) - Ribonuclease activity in the developing seeds of normal and opaque - 2 maize. Science, 155, (3768), 1573-1575.

DALBY A., CAGAMPANG G.B., (1970) - RNase activity in normal, opaque 2 and flour 2 maize, endosperm during development. Plant. Physiol., 46,(1) 142 -145.

DAVIDSON J.N., (1960) - La biochimie des acides nucléiques. (Dunod, Paris).

DAVIS B.J. (1964) - Disc Electrophoresis - II Method and application to human serum proteins. Ann. .N.Y. Acad. Sci. 121, 404 - 427.

DE LEO P., SACHER J.A., (1970) - Central of ribonuclease and acid phosphatase by auxin and abscisic acid during senescence of Rhoeo leaf sections. Plant. Physiol. 46, 806 - 811.

DE LEO P., SACHER J.A. (1971) - Effect of abscisic acid and auxin on ribonuclease during age ing of bean endocarp tissue sections. Plant and Cell. Physiol., 12, (5), 791 - 796.

DOVE L. D., (1967) - Ribonuclease activity of stressed tomato leaflets. Plant Physiol., 42, (9), 1176-1178.

FIELDS R., DIXON H.B.F., LAW G.R., YUI C., (1971) - Purification of ribonuclease T_1 by diethylaminoethylcellulose chromatography. Biochem. J. 121, (4), 591-596.

FIERS W., (1959) - Kolomchromatographie van gerst-Ribonuklease. Société Belge de Biochimie. Réunion de Liège, 21 mars, 510-511.

FIERS W., MOLLER K.M., (1960) - A micro-method for the determination of ribonuclease activity. Compte rendu Lab. Carlsberg, 31, (32), 507-540.

FIERS W., (1961) - The determination of ribonuclease activity. Anal. Biochem. 2, 126-139.

FIERS W., VANDENDRIESSCHE L., (1961) - The ribonuclease activity of barley. Arch. Intern. de Physiol. et de Biochim., 63, (3), 339-358.

FIERS W., (1962) - The chromatography of barley ribonuclease. J. of Chromatography , 7, 269-271.

FEEMAN K.B., (1964) - Some observations on ribonucleases from ray-grass. Canadian Journal of Biochemistry, 42, 1099-1109.

FRISCH-NIGGEMEYER W., REDDI K. K., (1957) - Studies on ribonuclease in tobacco leaves. I. Purification and properties. Biochem. Biophys. Acta, 26, 40 -46.

GRIPPO P., IACCARINO M., ROSSI M., SCARANO E., (1965) - Thin layer chromatography of nucleotides, nucleosides and nucleic acid bases. Biochim. Biophys. Acta, 95, 1-7.

GROSS M.,VIRMAUX N., MANDEL P., (1970) - Ribonuclease activity in the lens during differentiation. Life Sciences, 9 part II, (23), 1321-1326.

GRZESIUK S., KULKA K., (1971) - Nucleic acids and nucleases in cereal seeds of various age. Bull. Acad. Polon. Sc. C1. V, 19, (5), 363-366.

HADZIJEV D., MEHTA S.L., ZALIK S., (1969) - Nucleic acids acid ribonucleases of wheat leaves and chloroplasts. Can. J. Biochem. 47, (3), 273-282.

HANSON J.B., (1959) - The effect of ribonuclease on oxydative phosphorylation by mitochondria. J. Biol. Chem., 234, (5), 1303-1306.

HANSON J.B., WILSON C.M., CHRISPEELS M.J., KRUEGER W.A., SWANSON H.R., (1965) - Ribonuclease and other factors involved in the respiratory senescence of maize scutellum. J. of Experim. Bot., 16, (47), 282-293

HASHIMOTO J., UCHIDA T., EGAMI F. (1971) - Purification of ribonuclease U_1 and some properties of ribonucleases U_1 and N_1. J. Biochem., 70, (6), 903-911.

HILMOE R.J., (1960) - Purification and properties of spleen phosphodiesterase. The J. of Biol. Chem. 235, (7), 2117-2121.

HOLDEN M., PIRIE N.W., (1955) - The partial purification of leaf ribonuclease. Biochem. J., 60, 39-46.

HOLDEN M., PIRIE N.W., (1955) - A comparison of leaf pancreatic ribonuclease. Biochem. J., 60, 53-62.

HOLLEY R.W., APGAR J., DOCTOR B.P., FARROW J., MARINI M.A., MERRIL S.M., (1961) - A simplified procedure for the preparation of tyrosine and valine acceptor fractions of yeast "soluble ribonucleic acid". The J. of Biol. Chem. 236, (1), 200-202.

HSIAO T.C., (1968) - Ribonuclease activity associated with ribosomes of zea mays. Plant physiol., 43, (9), 1355-1361.

HSIAO T.C., HAGEMAN R.H., TYNER E.H., (1968) - Effects of potassium nutrition on ribonucleic acid and ribonuclease in zea mays. Plant Physiol. 43, (12), 1941-1946.

IBUKI F., AOKI A., MATSUHITA S., (1963) - Occurence of a phosphodiesterase in the insoluble fractions from wheat seedlings. Agr. Biol. Chem., 27, (4), 316-318.

IBUKI F., AOKI A., MATSUHITA S., (1964) - Phosphodiesterase found in young wheat roots. Agr. Biol. Chem., 28 (3), 144-150.

INGLE J., (1963) - Corn meal as a source of ribonuclease. Biochim. Biophys. Acta, 73, 331-334.

IRIE M., HARADA M., NEGI T., SAMEJIMA T., (1971) - Some chemical and physical properties of ribonuclease from Aspergillus saitoi, J. of Biochem., 69, (5), 881-892.

ISHII S., SUGIMOTO H., YOKOTSUKA T., (1967) - A ribonuclease from Mung Bean sprouts. I. Purification and some properties. Nippon Nogeihagakin Kaishi, 41, (7), 340-347 (en japonais).

IUPAC - IUB - Commission on Biochemical Nomenclature (C.B.N.) - (1970) Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their constituents. Biochem. J., 120, 449-454.

JAVILLIER M., POLONOWSKI M. et al., (1963) - Traité de biochimie générale. Tome II, Fasc. 2 : Enzymes. (Masson, Paris).

JOHNSON P.H., LASKOWSKI M., Sr (1970) - Mung bean nuclease I. II Resistance of double stranded desoxyribonucleic acid and susceptibility of regions rich in adenosine and thymidine to enzymatic hydrolysis. The J. of Bio. Chem. 245, (4), 891-898.

JOHNSON P.H., (1971) - Conformational specificity of mung bean nuclease I. Dissert. Abstr. 32, (1), 67B-68B.

JONES W., (1920) - The action of boiled pancreas extrac on yeast nucleic acid. Am. J. Physiol., 52,203.

KADO C.I., (1968) - Purification and properties of a ribonuclease isolated from etiolated cucumber seedlings. Archives of Biochem. And Biophys. 125, 86-93.

KALNITZKY G., HUMMEL J.P., RESNICK H., CARTER J.R., BARNETT L.B., DIERKS,N. (1959) - The relation of structure to enzymatic activity in ribonuclease. Ann. N.Y. Acad. Sci., 81, 542-569.

KAWATA H., KATAYA K., AKIMOTO M., NISHIMOTO K., (1969) - Etude des nucléases des germes de graines des plantes. I Recherche des nucléases (en japonais) J. Ferment. Technol. Japon, 47, (1), 25-31.

KESSLER B., ENGELBERG N., (1962) - Ribonucleic acid and ribonuclease activity in developing leaves. Biochim. Biophys. Acta. 55, 70-82.

KOBYLSKY G.I., POLEVOY V.V., (1969) - Effect of auxin on the activity of ribonuclease in corn coleoptile segments (en russe). Fiziol. Rast. 16, (1), 145-147.

KOMIYAMA T., IRIE M. (1971) - Purification and properties of a ribonuclease from Rhizopus species. J. Biochem., 70, 765-773.

KULKA K., (1969) - Aktywhość adenozynotrójfosfatazyi rybonukleazy w zarodkach ziarna jęczmienia jarejo w okresie spoczynku pozmiwnego. Acta. Soc. Botanium Polon. 38, (2), 247-254.

KUNITZ M., (1940) - Crystalline ribonuclease. The J. of Gen. Physiol. 24, 15.

KUNITZ M.,(1946) - The J. of Biol. Chem. 164, 563-568.A spectrophotometric method for the measurement of ribonuclease activity.

LADO P., RASI CALDOGNO F., PENNACCHIONO A., (1968) - Sullo svilippo di attivita RNAsica in foglie di avena e in frammenti delle medesime. Inst. Lombardo (Rend. Sc.), B 102, (2) , 277-284.

LANZANI G.A., LANZANI M.M., (1967) - A ribonuclease from the microsomes of wheat germs. Enzymologia, 32, (4/5), 236-240.

LÁZÁR G., FARKAS G.L. (1970) - Patterns of enzyme changes during leaf senescence. Acta. Bio. Acad. Sci. Hung. 21, (4), 389-396.

LAZARUS L.H., SCHERBAUM O.H., (1968) - Activity of ribonuclease, acid phosphatase and phosphodiesterase in Tetrahymena pyriformis during growth. J. Cell. Biol. 36, (2), 415-418.

LEDOUX L., GALAND P., HUART R., (1962) - Nucleic acid and protein metabolism of barley seedings. I. The parallelism between ribonucleic acid content and ribonuclease activity. Biochim. Biophys. Acta, 55, 97-104.

LESHEM Y., (1971) - Abscisic acid as a ribonuclease promoter. Physiol. Plant. 24, (1), 85 - 89.

LIN P.P.C., VARNER J.B., (1970) - 3′nucléodiase with and without nuclease activity from pea seedlings. Plant. Res. Mich. State Univ. (Atomic-Energy), 105-111.

LONTAI I., HORVATH M., ROJIK I., (1970) - Quantitative changes in the enzymic ribonucleic acid- Breakdown due to herbicide treatment of barley. Acta Bota.Acad. Sc. Hung, 16, (3-4), 321-327.

LORENZ (Von) B., LORENZ R., ZÖLLNER N., (1960) - Über den Einfluß von Kochsalz auf die Ribonuclease und ihre Hemmung durch Heparin. Z. für Naturforschung, 15b, 62-63.

LORING H.S., Mc LENNAN J.B., WALTERS T.L. (1966) - Enzymes of nucleic acid metabolism from mung bean sprouts. II The specificity of 3' nucleotidase activity and general properties of the 3' nucleotidase-ribonuclease M_2 fraction. The J. of Biol. Chem., 241, (12), 2876-2880.

MAC DONAND M.R., (1955) - Methods in enzymology, II, page 427 - Ed. par COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O., New York Acad. Press. Inc.

MAC HALE J.S., DOVE L.D., (1968) - Ribonuclease activity in tomato leaves as related to development and senescence. New Phytol., 67? (3), 505-515.

MACKO V., HONOLD G.R., STAHMANN M.A., (1967) - Soluble proteins and multiple enzyme forms in early growth of wheat. Phytochemistry, 6, (4), 465-471.

MALYSHEVA K. M., (1968) - Activité de la ribonucléase chez les variétés cotonnier de précocités différentes (en russe). Dokl. Akad. Nauk Uz., 23, (11), 47-48.

MARCHOUX G. (1968 a) - Purification et propriétés des substances extraites du piment, inhibitrices de l'infection virale. Thèse 3ème cycle. Fac. Sc. Marseille;

MARCHOUX G. (1968 b) - Effet inhibiteur des extraits de feuilles de piment (Capsicum annum L.). II Concentration et purification d'une fraction inhibitrice. "Etudes de Virologie". Ann. Epiphyties, 19, (H.S.), 21-30.

MARCHOUX G. (1969) - Corrélation entre les activités ribonucléasiques et inhibitrices de l'infection virale d'extraits foliaires de différentes espèces. Ann. Phytopatho. I, (2), 257-266.

MARCHOUX G., (1970) - Etude de l'inhibiteur extrait des feuilles de piment. III - Pureté antigénique de la substance active isolée et identifiée à une ribonucléase. Ann. Phytopatho. 2, (4), 629-637.

MARKOWSI A., PISKORNIK Z., (1970) - Ribonucleases activity in winter and spring wheat embryos during seed germination at 20°C and at vernalizen temperature 2°C. Bull. Acad. Pol. Sci. - Série Sci. Bio. 18, (3), 177-183.

MATSUSHITA S., (1959 a) - On the ribonuclease during the germination of wheat. Mem. Research Inst. Food Sci., Kyoto Uni., (17), 23-28;

MATSUSHITA S., (1959 b) - A comparison of ribonuclease found in the different locations of wheat seedlings. Mem. Research Inst. Food Sci., Kyoto Univ., (17), 29-41.

MATSUSHITA S., (1959 c) - Ribonuclease and related enzymes found in the microsome of young wheat roots. Mem. Research Inst. Food Sci., Kyoto Univ., (18), 8-21.

MATSUSHITA S., (1959 d) - On the protein formation and changes of the amount of RNA and RNase activity in the grains during the ripening process of wheat. Mem. Research Inst. Food Sci. Kyoto Univ., (19), 1-4.

MATSUSHITA S., IBUKIF., (1959) - The chromatography of ribonucleases in wheat seedlings. Mem. Research Inst. Food Sci., Kyoto Univ. (19), 5-10.

MATSUSHITA S., IBUKI F., (1960 a) - Nucleases found in the microsomes of young wheat roots. Mem. Research Inst. Food Sci., Kyoto Univ. (19), 11-16.

MATSUSHITA S., IBUKI F., (1960 b) - Ribonucleases in the microsome from pea seedlings. Biochim. Biophys. Acta, 40, 358-359.

MATSUSHITA S., MORI T., HATA T., (1966) - Enzymes activities associated with ribosomes from soybean seedlings. Plant. Cell. Physiol. Japan 7, (4), 533-545.

MEROLA A.J., DAVIS F.F., (1962) - Preparation and properties of soybean ribonuclease. Biochim. Biophys. Acta, 55, 431-439.

MIKHAILOVA I.Y., SPIRIDONOVA V.A., BOGDANOV A.A. (1971) - Action of RNA-ase III on the ribosomol RNA and ribosomes from E. Coli (en russe) Biokhimya, 36, (4), 774-779.

MIKULSKI A.J., LASKOWSKI M. Sr, (1970) - Mung bean nuclease I. III Purification procedure and (3') - W - monophosphatase activity. The J. of Bio. Chem. 245, (19), 5026-5031.

MILLIKAN D.F., GHOSH B.N., (1971) - Changes in nucleic acid associated with maturation and senescence in Hedera Helix. Physiol. Plant. 24, (1), 10-13.

MULTON J.L., GUILBOT A., (1967) - Effets sur l'activité ribonucléasique du blé d'un traitement thermique effectué sur le grain vivant, très humide. C.R. Acad. Sci. Paris, 264, (5), 763.

MULTON J.L., (1969 a) - Contribution à l'étude du rôle de l'eau dans les mécanismes de dénaturation thermique des protéines en milieu solide peu hydraté. Thèse de Doctorat d'Etat ès sciences appliquées, Fac. Sci. Paris N° au C.N.R.S. A.O. 3800.

MULTON J.L., (1969 b) - L'activité ribonucléasique dans les céréales. Méthode de dosage. Deuxième thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences appliquées. Fac. Sci. Paris. N° au C.N.R.S. A.O. 3.800.

MUNDRY K.W., (1965) - Automatic determination of ribonuclease activity in colum effluents. Technicon. Sympo. 2 nd, N.Y. London 1965, 612-614.

NENE Y.L., THORNBERRY H.H., (1970) - Tobacco Mosaïc virus : factors influencing the inhibition of infection on bean leaves by ribonuclease. Phytopath., 2, (67), 234-239.

NEURATH H., DIXON G.H., PECHERE J.F., (1960) - In proteins Proc. of the 4th Int. Cong. of Biochem. VIIIth Sympo. p. 63, Vienne. Pergamon Press London.

NOMURA A., SUNO M., MIZUNO Y. (1971) - Studies on 3' nucleotidase-nucléase from potato tubers. I. Purification and some properties of the enzyme. J. Biochem. 70, (6), 993-1001.

OGATA K., SONG S., YAMADA H. (1971) - Studies on extracellular ribonuclease from Yeast. Part. I. Purification and physico-chemical properties of RNase from Rhodotorula glutinis. Agr. Biol. Chem. 35, (1), 58-64.

OGUR M., ROSEN G., (1950) - The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. Arch. Biochem. Biophys. 25, 262-276.

PAUL A.K., MUKHERJI S., SIRCAR S.M., (1970) - Enzyme activities in germinating mugbean (Phaseolus aureus), seeds and their relations with promoter and inhibitors of protein synthesis. Osterr. Bot. Z 118, 311-320.

PHILLIPS D.R., FLETCHER R.A. (1969) - Ribonuclease in leaves of Phaseolus vulgaris during maturation and senescence. Phys. Plant., 22, 764-767.

PHILLIPS D.R., HORTON R.F., FLETCHER R.A. (1969) - Ribonuclease and chlorophyllase activities in senescing leaves. Phys. Plant., 22, 1050-1054.

PIERPOINT W.S., (1956) - The chromatography of leaf ribonuclease. Biochim. Biophys. Acta, 21, 136-141.

PILET P.E., (1969 a) - Action combinée de l'acide indolacétique et d'une ribonucléase sur la croissance, C.R. Acad. Sci. D 268, (6), 930-932.

PILET P.E., (1969 b) - Effet du fluor sur la teneur en RNA et l'activité RNasique des racines du Lens culinaris. C.R. Acad. Sci., D 269, (10), 954-957.

PILET P.E. (1970) - RNA metabolism and fluoride action. Fluoride, 3, (3), 153-159.

PILET P.E., BRAUN R., (1970 a) - Ribonuclease activity and auxin effets in the Lens root. Physiol. Plant. 23, 245-250.

PILET P.E., NOUGAREDE A., (1970 b) - RNA, structure, infrastructure et géotropisme radiculaires. Physio. Veg., 8, (2), 277-300.

PITT D. (1971) - Purification of a ribonuclease from potato tubers and its use as antigen in the inmunochemical assay of this protein following tuber damage. Planta, 101, 333-351.

PITT D., GALPIN M. (1971) - Increase in ribonuclease activity following mechanical damage of leaf and tuber tissues of solanum tuberosum L. Planta., 101, 317-332.

PRIVAT de GARILHE M., (1964) - Les Nucléases. Hermann Editeur Paris.

POULSON R., BEEVERS L., (1970) - Effects of growth regulators on ribonucleic acid metabolism of barley leaf segments. Plant. Physiol. 46, 782-785.

PROSKOURIAKOV N.I., NOUJIDINA T.N., (1960) - Les albumines du germe de froment et leur activité fermentative (en russe). Exposé scientifique de l'Ecole Supérieure Physiol. et Bioch. Plantes, (2), 148-152.

QUIRIN-STRICKER C., GROSS M., MANDEL P., (1968) - Influence d'une carence en protéines sur l'activité des ribonucléases et sur celle de leur inhibiteur dans le foie de rat. Biochim. Biophys. Acta, 159, 75-80.

REDDI K.K., (1958 a) - Ultraviolet absorption studies on tobacco mosaïc virus nucleic acid. Biochim. Biophys. Acta, 27, 1-4.

REDDI K.K., (1958 b) - Studies on tobacco leaf ribonuclease. II. Mechanism of action. Biochim. Biophys. Acta, 28, 386-391.

REDDI K.K., (1959) - Studies on tobacco leaf ribonuclease. III. Its role in the synthesis of tobacco mosaïc virus nucleic acid. Biochim. Biophys. Acta, 33, 164-169.

RICHARDS F.M., (1955) - An assay for ribonuclease activity using a cyclic phosphate substrate. C.R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chimie 29, 315-321.

ROBERTS D.W.A., (1967) - The wheat leaf phosphatases. VIII. A preparation with phosphotransferase activity. Canadian J. of Biochem., 45, 401-408.

ROBERTS D.W.A., (1970) - A survey of the wheat leaf phosphatase using gel filtration with Sephadex G 200. Enzymologia, 39, (3), 151- 165.

ROTH J.S., MILSTEIN S.W., (1962) - Ribonuclease. I. A new assay method with P32 labelled yeast ribonucleic acid. J. Biol. Chem., 196, 489-498.

SACHER J.A., (1969) - Hormonal control of senescence of bean endocarp : auxin suppression of RNase. Plant Physiol., 44, (2), 313-314.

SAMULKA J., (1971) - Electrophoretic investigation of ribonuclease in roots and leaves of vicia faba L. Bio. Plant. 13, (4), 243-246.

SATO-ASANO K., EGAMI F., (1958) - Réactions synthétiques par la ribonucléase T_1, Biochim. Biphys. Acta, 29, 655-656.

SCHEGGIA E.R., (1965) - Activité ribonucléasique dans les liquides biologiques estimée par la détermination des dérivés uridiniques. Rev. Asoc. Bioquim. Argent. 157, 1.

SCHEGGIA E.R., TREMOLIERES J., (1967) - Mise en évidence d'activités ribonucléasiques dans le plasma de rat sous l'influence de l'éthanol à dose toxique. Fd. Cosmet. Toxicol., 5, 371-374.

SCHEGGIA E.R.,(1967) - Etude de l'activité ribonucléasique dans diverses céréales. Nutr. Dieta, 9, (2), 124-128.

SCHEGGIA E.R., TREMOLIERES J., (1968) - Mise en évidence d'une activité antiribonucléasique par modification de la molécule de ribonucléase C.R. Soc. Bio., 162, (7), 1311-1316.

SCHEGGIA E.R., TREMOLIERES J., (1969 a) - Etudes des facteurs modifiant l'activité ribonucléasique tissulaire. C.R. Soc. Biol., 163, (7), 1532-1537

SCHEGGIA E.R., TREMOLIERES J., (1969 b) - Variations de l'activité ribonucléasique des tissus en fonction du temps d'incubation. C.R. Soc. Bio. 163, (10), 2097-2100.

SCHLAMOWITZ M., GARNIER R.L., (1947) - The ribonucleinase of the soybean isolation of the enzyme. J. Biol. Chem. 487-497.

SCHMIDT G., CUBILES R., NEPOMUK Z., HECHT L., STRICKLER V., SERAIDARIAN K. SERAIDARIAN M., THANNHAUSER S.J., (1951) - On the action of ribonuclease. J. Biol. Chem. 192, 715-726.

SEMENENKO G.I., (1955) - De l'activité de la ribonucléase des semences de froment et de pois en germination et maturation (en russe). Exposé de l'Académie des Sciences de l'U.R.S.S., 102, (3), 575-577.

SHORTMAN K., (1961) - Studies on cellular inhibitions of ribonuclease. I. the assay of the ribonuclease inhibitor from rat liver. Biochim. Biophys. Acta, 51, 37-49.

SHUSTER L., KAPLAN N.O., (1953) - A specific b nucleotidase. J. Biol. Chem. 201, 535-546.

SHUSTER L., (1957) - Ray-grass nucleases. J. Biol. Chem., 229, 289-303.

SHUSTER L., KHORANA H.G., HEPPEL L., (1959) - The mode of action of ray-grass ribonucleases. Biochim. Biophys. Acta, 33, 452-461.

SINGH D.V., KRISHNAN P.S., (1971 a) - Nuclease activity in tissues of angiosperm parasites. Phytochem. 10, 281-287.

SINGH D.V., KRISHNAN P.S., (1971 b) - Nuclease activity in chloroplasts from dodder filaments. Phytochem. 10, (4), 739-747.

SIRAKOV L.M., KOCHAKIAN C.D., (1969) - The stability of ribonuclease inhibitor from guinea - pig liver - Biochim. Biophys. Acta, 195, 572-575.

SISSAKIANE N.M., VASSILIEVA N.A., KOCHTOIANTZ N.N., (1957) - La ribonucléase de la graine de froment en germination. Exposé de l'Académie des Sciences de l'U.R.S.S., 112, (2), 300-302 (en russe).

SIWECKA M.A., SZARKOWSKI J.W. (1971) - The distribution of nucleolytic activity in organellae of rye embryos and seedlings (Secale cereale) Bull. de L'Acad. Polon. Sciences. Série Sc. Biol. C1. II, 19, (7-8). 445-44

SODEK L., WRIGHT S.T.C., (1969) - The effect of kinetin on RNase, acid phosphatase, lipase and esterase levels in detached wheat leaves. Phytochemistry, 8, (9) - 1629-1640.

SODEK L., WRIGHT S.T.C., WILSON C.M., (1970) - Effect of EDTA on two RNases from wheat leaves. Plant and Cell. Physiol., 11, 167-171.

SPAHR P.F., HOLLINGWORTH B.R., (1961) - Purification and mechanism of action of ribonuclease from Escherichia coli ribosomes. The J. of Biol. Chem., 236, (3), 823-831.

SPERLING R., STEINBERG I.Z., (1968) - Polarimetric assay of the activity of ribonuclease on cyclic nucleotides. Biochim. Biophys. Acta, 159, 408-410.

SPERLING R., STEINBERG I.Z., (1971) - Elongation of the disulfide bonds of bovine pancreatic ribonuclease and the effect of the modification on the properties of the enzyme. The J. of Biol. Chem. 246, (5), 715-718.

SRIVASTAVA B.I.S., (1968 a) - Increase in chromatin associated nuclease activity of excised barley leaves during senescence and its suppression bu kinetin. Biochem. Biophys. Res. Communic. 32, (3), 533-538.

SRIVASTAVA B.I.S., (1968 b) - Studies on the chromatin of barley leaves during senescence. Biochem. J., 110, (4), 683-686.

SRIVASTAVA B.I.S., MATSUMOTO H., CHADHA K.C., (1971) - Studies on chromatin associated nuclease from barley leaves. Plant and Cell. Physio. 12, 609-618.

STAHL J.C., EBEL J.P., (1963) - Séparation des acides ribonucléiques et des nucléosides mono, di et triphosphates sous forme de sels d'ammonium quaternaire. Bull. Soc. Chimie Bio., t 46, (2-3), 395-397.

STEIN W.H., (1965) - The structure and the activity of ribonuclease. Israel J. Med. Sci., 1, (6), 1229-1243.

STOCKX J., VAN PARIJS R., (1961 a) - The Phosphomonoesterase activity of Phaseolus aureus roxb : occurence of a 3' - nucleotidase. Arch. Internat. de Physio et de Bioch., 69, (2), 194-202.

STOCKX J., VANDENDRIESSCHE L., (1961 b) - The ribonuclease of Phaseolus aureus roxb. I. Purification of enzyme. II. General properties and stability against denaturing agents. III. Effectors and specificity. Arch. Intern. de Physiol. et Biochim., 69, (4), 493-504 ; 521-544 ; 545-562.

SUNG S.C., LASKOWSKI Sr M., (1962) - A nuclease from mung bean sprouts. The J. of Biol. Chem., 237, (2), 506-511.

TABORSKY G., (1959) - Chromatography of ribonuclease on carboxymethyl cellulose columns. The J. of Biol. Chem., 234, (10), 2652-2656.

TAKAHASHI K., (1971) - The structure and function of ribonuclease T_1. J. Biochem., 70, 603-634.

TANG W.J., MARETZKI A., (1970) - Purification and properties of leaf RNase from sugar cane. Biochim. Biophys. Acta, 212, (2), 300-307.

TAN C.H. (1971) - An agar diffucion method for quantitative determination of ribonuclease. Biochim. Biophys. Acta, 247, 463-467.

THOMAS P., (1966) - Etude, en microscopie électronique, de l'action de la pepsine et de la ribonucléase sur des cellules méristématiques de radis et de courge. C.R. Acad. Sc. Paris, 262-D, 745-748.

TIMASHOV N.D., (1967) - Influence du bore sur la teneur en acides ribonucléiques, sur la composition de leurs nucléotides et sur l'activité de la ribonucléase des structures cytoplasmiques du tournesol. (en russe). Mikroclementy v sel'skom khozjajstve i medicine. III Kiev Naukova Dumka, 35-39.

TONE M., OZAKI A., (1968) - A ribonuclease from phoma cucurbitacerum. Enzymologia, 34, (2), 101-128.

TRUELSEN T.A., (1967) - Indolacetic-acid induced decrease of the ribonuclease activity in vivo. Physiol. Plant., 20, (4), 1112-1119.

TUVE T.W., ANFINSEN C.B., (1960) - Preparation and properties of spinach ribonuclease. The J. of Biol. Chem. 235, (12), 3437-3441.

UDVARDY J., FARKAS G.L., (1966) - Drifts in enzyme levels in detached senesceing barley leaves and their relation to enzyme changes in diseased tissues. Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hungar., 1, (1-2), 19-27.

UDVARDY J., FARKAS G.L., MARRE E., FORTI G., (1967) - The effect of sucrose and light on the level of soluble and particle - bound ribonuclease activities in excised Avena leaves. Physiol. Plant., 20, (3) 781-788.

VAN ZANTEN A., GRUBER M., (1962) - Ribonuclease : structuur en Werking Chem. Weekbland, 58, 585-591.

VLASJUK P.A., KOVAL'CHUK M.I. (1971) - Modifications de l'activité des nucléases en carence manganique chez les plantes (en russe). Fiziol. Biokhim Kul'tur. Rasten S.S.S.R., 3, (5), 456-459.

VOLD E.S., SYPHERD P.S., (1968) - Changes in soluble RNA and ribonuclease activity during germination of wheat. Plant. Physiol., 43, (8); 1221-1226.

WALTERS T.L., LORING H.S., (1966 a) - Enzymes of nucleic acid metabolism from mung bean sprouts. I. Fractionation and concentration of phosphomonoesterase, ribonucleases M_1 and M_2, 3' nucleotidase, and deoxyribonuclease. The J. of Biol. Chem., 241, (12), 2870-2880.

WALTERS T.L., LORING H.S., (1966 b) - Enzymes of nucleic acid metabolism from mung bean sprouts. III. The identification of 5' mononucleotides as hydrolysis products of ribonuclease M_2. The J. of Biol. Chem. 241, (12), 2881-2885.

WENZEL G., (1971) - Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Ribonuklease - Aktivität und der Infizierbarkeit von tabak mit phytopatogenen Viren. Phytopath. 71, 193-202.

WILSON C.M., (1963 a) - A chromatographic separation of ribonuclease in corn. Biochim. Biophys. Acta, 68, 177-184.

WILSON C.M., (1963 b) - Substrate and product specificity of two plant ribonucleases. Biochim. Biophys. Acta, 76, 324-326.

WILSON C.M., (1967) - Purification of a corn ribonuclease. J. Biol. Chem. 242, (9), 2260-2263.

WILSON C.M., (1968 a) - Plant nucleases. I. Separation and purification of two ribonucleases and one nuclease from corn. Plant Physiol., 43, 1332-1338.

WILSON C.M., (1968 b) - Plant nuclease II. Properties of corn ribonuclease. I. and II and corn nuclease I. Plant Physiol. 43, (9), 1339-1346.

WILSON C.M., (1969) - A rapid staining technique for detection of RNase after polyacrylamide gel electrophoresis. Analy. Bioch., 31, (1-3), 506-511.

WILSON C.M., (1971) - Plant nuclease. III Polyackylamide gel electrophoresis of corn ribonuclease isoenzymes. Plant. Physiol., 48, 64-68.

WOLF G., (1968) - Nachweis pflanzlicher Ribonukleasen in Polyacrylamid-Gelennach disk Elektrophorese. Experimenta, 24, (9), 890-891.

WOODROOF E.A., GLITZ D.G., (1971) - Purification and characterization of two extracellular ribonucleases from Rhizoplus oligosporum. Biochem. 10, (9), 1532-1540.

WUNNER W.H., (1965) - Studies in vitro on the role of ribonuclease in protein biosynthesis. Dissertation Abstr. 26, (1), 74.

WYEN N.V., VDVARDY J., SOLYMOSY F., MARRE E., FARKAS G.L., (1969) - Purification and properties of a ribonuclease from avena leaf tissues. Bioch. Biophys. Acta, 191, 588-597.

WYEN N.V., UDVARDY J., FARKAS G.L., (1971 a) - Changes in the level of acid phosphatase in avena leaves in response to cellular injury. Phytochem. 10, (4), 765-770.

WYEN N.V.; ERDEI S., FARKAS G.L. , (1971 b) - Isolation from avena leaf tissues of a nuclease with the same type of specificity towards RNA and DNA. Accumulation of the enzyme during leaf senescence. Bioch. Biophys. Acta, 232, (3), 472-483.

WYEN N.V., FARKAS G.L., (1971) - On the nature of nuclease activity associated with cytoplasmic ribosomes isolated from avena leaves. Bioch. Physiol. Pflanzen (BPP), Bd 162, (3), 5220-5224.

YASH PAL (1966) - Boron deficiency and ribonuclease activity in plants. Indian J. Biochem. 3, (4), 263-264.

YECHER A.S., GOLYSNKAYA L.A. (1971) - Nuclease activity of extraits of germinating lupinum seeds (en russe). Dok. Akad. Nauk Belousskii S.S.S.R. (Proc. of the Acad. of Sc. of B) . 15, (11), 1034-1037.

YOSHIDA N., INOVE H., SASAKI A., OTSUKA H., (1971) - Ribonuclease from streptomyces erythreus. Purification and properties. Biochim. Biophys. Acta, 228 (3), 636-647.

ZIMMERMAN S.B., SANDEEN G., (1965) - A sensitive assay for pancreatic ribonuclease. Analytical Biochem., 10, (3), 444-448.

ACADÉMIE DE PARIS

UNIVERSITÉ DE PARIS VI

4, Place Jussieu - 75230 PARIS-CEDEX 05

SERVICE DE LA SCOLARITE

Bureau des Enseignements du 3e cycle

TÉLÉPHONE : 336-25-25 - 325-12-21

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : DOCTEUR - INGENIEUR

THESE DE :

NOM : Monsieur TRENTESAUX

Prénoms : Etienne

né le 5 janvier 19 41 à ROUBAIX Dépt : Nord

1ère THESE : "Evolution de certaines caractéristiques physiologiques, biochimiques et technologiques du blé en grain (T.aestivum L.) en fonction de la température, de l'hygrométrie et de la durée, en atmosphère renouvelée."

2e THESE (Propositions faites par l'Université) :

PRESIDENT : M. ULRICH

Examinateurs : M. MAZLIAK
M. GUILBOT

Vu et Approuvé

PARIS, le 9 octobre 1972

Le Président

de l'Université de PARIS VI